

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-  
Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Die akute Wirkung von Erythropoietin am ischämischen Maus- und  
Schweineherz

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hanns-Christoph Held

aus  
Regensburg

2013

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-  
Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Die akute Wirkung von Erythropoietin am ischämischen Maus- und  
Schweineherz

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hanns-Christoph Held

aus  
Regensburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Priv.Doiz. Dr. med. René Schramm  
Prof. Dr. med. Bernhard Heindl  
Prof. Dr. med. Christian Weber

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. R. Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2013

Meinen lieben Eltern

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>03</b>
1.1 Myokardinfarkt	03
1.1.1 Definition	03
1.1.2 Epidemiologie	04
1.1.3 Pathologie des Myokardinfarktes	04
1.1.4 Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden	06
1.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes	08
1.2 Erythropoietin	10
1.2.1 Biochemie und Physiologie	10
1.2.2 Anwendungen und Entwicklung	13
1.3 Embryonale endotheliale Progenitor Zellen	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2 Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 In vitro Versuche	17
2.1.1 Myozytenapoptose	17
2.1.2 Adhaesionsversuche	18
2.2 In vivo Versuche	19
2.2.1 Langendorff-Versuch	19
2.2.2 Ischämie/Reperfusionsschaden am Schweineherzen in einem Modell des perkutanen akuten Myokardinfarktes	22
2.2.2.1 Erster Versuchstag	22
2.2.2.2 Zweiter Versuchstag	24
2.3 Auswertung der in vivo Versuche	25
2.3.1 Western Blots	25
2.3.2 Myeloperoxidase	27
2.3.3 Histologische Auswertung	28
2.4 Statistik	28
<b>3 Eigene Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1 In vitro	29
3.1.1 Myozyten	29
3.1.2 In vitro Adhäsionsversuch	30
3.2 In vivo	32
3.2.1 Western Blot	32

3.2.1.1	Maus	32
3.2.1.2	AKT im porcinen Herzgewebe	34
3.2.1.3	Myeloperoxidase	36
3.2.1.4	Vergleichende Darstellung EPO und EPCs	36
3.2.2	Funktionsmessungen	38
3.2.2.1	LVEDP	38
3.2.2.2	Regionale Myokardfunktion	39
3.2.3	Blutbild	41
3.2.4	Analyse der Infarktgröße	42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1	Auswahl der Versuchstiere	46
4.2	Auswahl der Methoden	47
4.2.1	In vitro Versuche	47
4.2.2	Regionale Kardioprotektion durch Erythropoietin	48
4.3	Eigene Ergebnisse	49
4.3.1	Einfluss von Erythropoietin auf den Zelltod nach Hypoxie und Reoxygenierung	49
4.3.2	Einfluss von Erythropoietin auf die AKT-Expression und –Phosphorylierung	51
4.3.3	Einfluss von Erythropoietin auf die Leukozyteninvasion in das Ischämiegebiet	53
4.3.4	Einfluss von Erythropoietin auf die Infarktgröße	53
4.3.5	Einfluss von Erythropoietin auf die Myokardfunktion	55
4.4	Kardioprotektives Potential von Erythropoietin im Vergleich zu EPCs	55
4.5	Applikation	59
4.6	Klinische Erfahrungen mit Erythropoietin	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
Anlage 1	Westernblots und Myeloperoxidase	86

# **1 Einleitung**

## **1.1 Myokardinfarkt**

Weltweit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Todesursache Nummer Eins (1). Fast jeder zweite Todesfall (42%) in Deutschland geht auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zurück. Das statistische Bundesamt fasst unter den kardiovaskulären Erkrankungen drei Entitäten zusammen:

1. die chronisch ischämische Herzerkrankung,
2. den akuten Myokardinfarkt und
3. die Herzinsuffizienz (2).

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung rechnet die UN mit einer Zunahme der kardiovaskulär bedingten Todesfälle um mehr als ein Drittel (37%) im Jahr 2030 (1).

### **1.1.1 Definition**

Ein Myokardinfarkt entsteht meist auf dem Boden einer koronaren Herzkrankheit. Er ist durch eine hochgradige Stenose bzw. einen Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien mit konsekutiver Myokardnekrose gekennzeichnet. Es existieren mehrere zum Teil unterschiedliche Definitionen der verschiedenen Fachgesellschaften. Laut WHO z. B. liegt ein Herzinfarkt vor, wenn bei einer instabilen Angina pectoris Marker einer Myokardschädigung nachweisbar sind (Troponin T, I oder CK-MB) (3,4). Aufgrund der problematischen Definition und Diagnostik hat sich der Begriff des akuten Koronarsyndroms (ACS) in den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Kardiologie durchgesetzt. Dieser umfasst den ST Hebungsinfarkt (STEMI), den Infarkt ohne ST Hebung (NSTEMI, instabile Angina pectoris) und den plötzlichen Herztod (5).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Trotz rückläufiger Herzinfarktmorbidität führen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die Todesursachenstatistik in der Häufigkeitsverteilung an (1,2,5). Dies ist durch den Lebensstil mit fettreicher Ernährung, Stress und Bewegungsmangel bedingt. Trotz vielfältiger Präventionsbemühungen - zum Beispiel durch eine verbesserte Sportförderung - sinkt die Mortalität jedoch nicht wie gewünscht. So werden im Jahre 2006 45% der Todesfälle in Deutschland durch Herzkreislauferkrankungen verursacht (6). In Deutschland liegt die Inzidenz für einen Myokardinfarkt bei 300/100000 Einwohnern pro Jahr. Die Lebenszeitprävalenz für Männer beträgt 30%, für Frauen 15%.

Die geschlechtlichen Unterschiede beim Verlauf der Erkrankung (Männer 52% Letalität, Frauen 62% Letalität) egalisieren sich seit Beginn der Studie der kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA) 1985 (7). Zwei Drittel der Patienten versterben bereits vor Erreichen der Klinik (8).

Eine aktuelle Übersicht aus den Vereinigten Staaten bestätigt diesen Trend. 33,6% der Todesfälle werden trotz insgesamt rückläufiger Zahlen (1997-2007) durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht. In dieser Veröffentlichung wird auch deutlich, dass Risikofaktoren wie Übergewicht, Hypercholesterinämie und Hypertonus weit verbreitet sind. Gerade die hohe Zahl an krankhaft Übergewichtigen ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) von 33,7% ist in dieser Hinsicht prognostisch ungünstig (9). In der Zusammenschau der aktuellen Zahlen ist die Abnahme der Mortalität eher durch eine geringere 28-Tage-Mortalität und eine sinkende Zahl der Reinfarkte zu erklären als durch eine geringere Inzidenz (10).

### **1.1.3 Pathologie des Myokardinfarktes**

Bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) handelt es sich um die Manifestation einer Arteriosklerose in den Koronararterien. Die Pathogenese der Arteriosklerose ist unter anderem durch die „response to injury“-Hypothese zu erklären (11,12). Diese besagt, dass ein Gefäß auf eine Verletzung bzw. eine funktionelle Störung mit Sklerosierung reagiert. Ursachen für eine Beeinträchtigung der Integrität der Arterie können oxidativ



und/oder enzymatisch modifizierte Lipoproteine (vor allem LDL), mechanische, virale oder immunologische Vorgänge sein (12). An die Läsion lagern sich vermehrt Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten an, durchwandern das Endothel und akkumulieren in subendothelialen Schichten. Durch die Aufnahme von Fettsäuren entwickeln sich aus diesen Zellen Schaumzellen, die zusammen mit glatten Muskelzellen die sogenannten „fatty streaks“ bilden. Am Ort der Läsion können sich, durch Mediatoren begünstigt, Thromben absetzen, die ihrerseits wiederum Wachstumsmediatoren freisetzen und so den Prozess der Plaquebildung weiter unterhalten (11,12). Die alleinige Lumeneinengung durch arteriosklerotische Veränderungen führt jedoch für sich genommen noch zu keiner akuten myokardialen Ischämie. Erst die Ruptur eines solchen Belages zeichnet dann für ein akutes kardiovaskuläres Ereignis verantwortlich.

Oxidativer Stress bzw. entzündliche Vorgänge werden als Ursache für Plaqueinstabilitäten derzeit untersucht. Es wird vermutet, dass Sauerstoffradikale die Inflammation entweder initiieren bzw. zumindest stark beschleunigen können (13,14). Auch spezifische Infektionen, wie zum Beispiel mit *Chlamydia pneumoniae*, werden als Grund für die Ruptur eines solchen Plaques diskutiert (15). Durch die Ruptur der fibrous cap, die den Plaque von der Blutzirkulation trennt, werden gerinnungsaktive Mediatoren freigesetzt, die die Entstehung eines Thrombus triggern. Der Verschluss eines Koronargefäßes durch diesen Thrombus führt dann zur absoluten Ischämie eines Myokardareals, zum Infarkt (16). Durch Unterbrechung der Zufuhr von sauerstoffreichem Blut wird die aerobe Glykolyse auf anaeroben Stoffwechsel umgestellt und der ATP-Spiegel sinkt. Aufgrund dieses Vorgangs fehlt die für die Ionenpumpen nötige Energie und es kommt zu einer Ionenverschiebung mit vermehrtem Wassereinstrom in die Zelle. Nach ca. 30 Minuten ist die Schädigung des Myokards irreversibel (17).

Die Infarktgröße wird nicht nur durch den Ort der Okklusion des Gefäßes bedingt, sondern auch durch Entzündungs- und Abräumprozesse, die dem akuten Stadium folgen. Nach 24-48 Stunden entsteht eine Koagulationsnekrose mit Infiltration neutrophiler Granulozyten. Makrophagen phagozytieren die abgestorbenen Myozyten, wodurch intrazelluläre Kaskaden bzw. eine neurohumorale Aktivierung initiiert werden. In dieser Phase kann sich das Infarktgebiet vergrößern (18). Dieser Vorgang wird bedingt durch das Freisetzen von Serinproteasen und Matrixmetalloproteasen aus den neutrophilen Granulozyten. Das intrazelluläre Kollagen wird hierdurch

degradiert (19).

Diese Vorgänge können auch Zellen in Gewebsarealen, die initial nicht nekrotisch wurden, zum Untergang bringen. Durch den Verlust an Myokardgewebe lässt die Kontraktilität des Ventrikels nach, die Vorlast wird erhöht und der adrenerge Schenkel des autonomen Nervensystems aktiviert. Der Vorlastanstieg und die sympathische Aktivierung triggern den konsekutiven Umbau des Herzmuskelgewebes nach dem Ereignis, das Remodeling (19,20).

#### **1.1.4 Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden**

Die schnelle Wiedereröffnung des betroffenen Gefäßes ist eine *conditio sine qua non* für den Erhalt funktionsfähigen Myokards im Fall eines akuten Myokardinfarktes (21-23). Durch diese Maßnahme wird die Ischämie aufgehoben und das hypoxische Areal wieder mit arterialisiertem Blut versorgt. Die erneute Versorgung des initial ischämischen Gebietes führt paradoxerweise zu einer weiteren Schädigung von zunächst vitalem Herzmuskelgewebe.

Der Reperfusionsschaden umfasst mehrere pathophysiologische Entitäten. Zu diesen gehören eine reversible, funktionelle Störung der Myozyten (*myocardial stunning*), ein mikrovaskulärer, endothelialer Schaden (*no reflow phenomenon*) sowie die reperfusionsbedingten Arrhythmien (24-26). Als Mediatoren für diese Entitäten kommen mehrere postischämische Vorgänge in Frage. Im Einzelnen sind diese: oxidativer Stress, intrazelluläres Kalzium-Überangebot und die damit verbundene Hyperkontraktilität der Herzmuskelzellen, die rasche Normalisierung des pH-Wertes, die Inflammation und eine Öffnung der „mitochondrial permeability transition pore“ (PTP) (26).

Die Reperfusion per se verursacht oxidativen Stress (27). Die erneute Versorgung des ehemals ischämischen Areals verursacht zusätzlichen Schaden an vitalem myokardialen Gewebe. Diese Tatsache wird als das Sauerstoff-Paradoxon bezeichnet (28). Des weiteren wird durch den oxidativen Stress die verfügbare Menge an NO verringert. NO hat kardioprotektive Eigenschaften, die dadurch nicht mehr zur Verfügung stehen. Zu diesen Eigenschaften gehören: Eine antiadhäsive Wirkung auf die neutrophilen Granulozyten im betroffenen Gebiet, die Reduktion von Sauerstoffradikalen und der verbesserte myokardiale Blutfluss (29).

Ein anderer pathologischer Mechanismus, der zu Beginn der Reperfusion auftritt, ist der akute Anstieg des intrazellulären Kalziums. Verantwortlich hierfür sind Schädigungen der Ionentransportsysteme in Sarkolemm und sarkoplasmatischem Retikulum. Diese Änderungen überfordern die physiologischen Kalziumregulationsmechanismen und ergeben so einen exzessiven Anstieg des intrazellulären Kalziums (30). Dies führt im Myokard durch Dauerkontraktion zu zusätzlichem Zelluntergang. Eine pharmakologische Senkung des intrazellulären Kalziumspiegels kann experimentell die Infarktgröße um bis zu 50% senken (31,32). Auf den klinischen Alltag können diese Ergebnisse jedoch nicht übertragen werden (33,34).

Interessanterweise führt auch die rasche Normalisierung des pH-Werts zu einem vermehrten Zelluntergang. Dies geschieht zum einen durch das Auswaschen von Lactat, zum anderen durch die Aktivierung des Na/H<sup>+</sup> Transporters und durch den Na/HCO<sub>3</sub> Symporter (35). Der daraus resultierende Schaden mag durch die Öffnung des PTPs erklärt werden, auf den im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird (36). Nach Bond et al. wird die Normalisierung durch Applikation eines sauren Mediums in der Ratte verzögert und so ein kleineres Infarktareal gesehen. Auch hier können die tierexperimentellen Daten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden (34).

In der postischämischen Phase werden Leukozyten für die Aufgabe rekrutiert, nekrotische Zellen abzuräumen und ggf. durch eine physikalisch tragfähige fibrotische Narbe zu ersetzen. An diesem Prozess sind vor allem neutrophile Granulozyten und Macrophagen beteiligt. Zytokine wie Interleukin 6 und TNF alpha, die vom geschädigten Myokard freigesetzt werden, initiieren bzw. verstärken diesen Prozess (37). Jedoch haben diese beiden Zytokine nicht nur Einfluss auf die Migration von Granulozyten, sondern wirken auch auf lebende kardiomyozytäre Zellen und beeinflussen so Apoptose und Zellüberleben. Durch Aktivierung des ischämischen Endothels werden weitere proinflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle (Selektine, ICAM-1) exprimiert. Durch die vermehrt adhätierenden Immunzellen wird die postischämische Inflammation verstärkt und die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies im Ischämiegebiet gesteigert. So schädigen Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid das umliegende Myokard über den ischämiebedingten Schaden hinaus. Die isolierte antiinflammatorische Therapie der Inflammation während des postischämischen Reperfusionsschadens erbringt jedoch klinisch auch keinen maßgeblichen Benefit (26).

Ein weiterer wichtiger Faktor bezüglich des Reperfusionsschadens ist die „mitochondrial permeability transition pore“. Dieser unspezifische Kanal der inneren mitochondrialen Membran führt in geöffnetem Zustand zu einem Zusammenbruch des Potentials an dieser Stelle. Es kommt zur Verarmung an ATP und zum konsekutiven Zelltod. Während der Ischämie bleibt dieser Kanal geschlossen. Im Rahmen der bereits oben genannten Zellschädigungen zu Beginn der Reperfusion öffnet sich dieser Kanal (36,38).

Im experimentellen Setting kann der Reperfusionsschaden das initial zugrunde gegangene Areal zum Teil deutlich vergrößern (39). Bis zu 50% der endgültigen Infarktgröße können im Tierversuch durch den Reperfusionsschaden bedingt sein (26).

### **1.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes**

Zentraler Punkt der Therapie des akuten Myokardinfarktes ist die möglichst schnelle Wiedereröffnung des betroffenen Gefäßes. Dies kann entweder mittels Thrombolyse geschehen oder mittels percutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA). Bei Erreichbarkeit eines Zentrums mit Katheterlabor innerhalb von 60-90 min nach Infarkt ist primär eine perkutane koronare Intervention anzustreben (28).

Die Sterblichkeit kann durch adjuvante Blutplättcheninhibition z. B. Applikation von Azetylsalicylsäure 75-325 mg (40), Heparin und GPIIb/IIIa Rezeptorinhibitoren (22) gesenkt werden.

Die genannten Thrombozytenaggregationshemmer verhindern ein weiteres Anwachsen des Thrombus, indem sie die Blutplättchen meist irreversibel inaktivieren und die Gerinnungskaskade unterbrechen. Ebenfalls sollen sie weitere thrombembolische Ereignisse während der folgenden Intervention verhindern. In der Zeit vor der Intervention sollte die Herzarbeit möglichst ökonomisiert werden. Dies kann durch Senkung der Herzfrequenz mit Betablockern erreicht werden. Neben der Verabreichung von Clopidogrel vor einer PCI haben auch Statine, ACE-Hemmer und Betablocker den Eingang in die Empfehlung des ERC gefunden (41). ACE-Hemmer haben einen positiven Effekt auf die frühe Mortalität und auf das Langzeitüberleben. Bei früher Applikation von Lisinopril wird eine verminderte Letalität im Krankenhaus beobachtet. So kommt es unter der Therapie mit ACE-Hemmern seltener zu myokardialen Rupturen, zu elektromechanischen Entkopplungen und zum kardiogenen Schock.

Auch während des Beobachtungszeitraums von fünf Jahren konnten in einer italienischen Studie eine Verringerung der Mortalität nach frühzeitiger ACE-Hemmer-Gabe beobachtet werden (42).

Die leitliniengerechte Behandlung nach einem kardiovaskulären Ereignis sollte wie oben erwähnt ACE-Hemmer, Clopidogrel und Aspirin sowie Betablocker beinhalten. Diese Pharmakotherapie hat das Ziel, Risikofaktoren wie Hypertonie und Hypercholesterinämie auszuschalten und das Remodeling nach dem Infarkt positiv zu beeinflussen (43). Dies wird in der Studie von Kernis et al bestätigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten auch nach einer koronaren Intervention von einer Betablockade profitieren. Nicht nur die Mortalität, sondern auch Komplikationen, wie zum Beispiel Reinfarkte oder Stentthrombosen, konnten durch Verabreichung des Medikaments im Beobachtungszeitraum verringert werden (44).

Die Inzidenz der akuten Herzinsuffizienz auch als Komplikation nach einem akuten kardiovaskulären Ereignis zeigt sich in den letzten zwanzig Jahren nicht rückläufig. Aufgrund der oben genannten Behandlungsstrategien ist jedoch die Mortalität deutlich gesunken (45).

Die Letalität nach einem Herzinfarkt ist jedoch nach wie vor hoch. Besonders in der akuten Phase versterben über die Hälfte der Betroffenen. Ca.58% der Patienten versterben prähospital, 28% am ersten Tag (46). Es besteht also trotz der oben erwähnten etablierten, medikamentösen und interventionellen Therapien nach wie vor der Bedarf an additiven Ansätzen, um diese noch recht hohe Letalität gerade am ersten Kliniktag zu senken. Limitierend scheint hier die Herzinfarktgröße zu sein. Untergegangenes Myokard wird durch diverse Umbauprozesse narbig verändert und kann die eigentliche Funktion nicht mehr wahrnehmen. Als Determinanten hierfür spielen nicht nur die Größe des betroffenen Gefäßes und damit die Größe des Versorgungsgebietes eine Rolle, sondern auch zahlreiche zellbiologische Vorgänge wie z. B. die Apoptose (24,25). Wie bereits erwähnt ist der Reperfusionsschaden maßgeblich für die endgültige Infarktgröße verantwortlich (26). Eine zytoprotektive Kaskade, die während der Reperfusion eine Rolle spielt, ist die so genannte Reperfusion injury salvage Kaskade (RISK). Diese umfasst zum einen den PI3K-AKT pathway, zum anderen den bereits erwähnten ERK  $\frac{1}{2}$  pathway. Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Cardiotrophin-1 (CT-1), Urocortin und Bradykinin wirken über diesen Weg (47). Eine weitere

Substanz, die auf diese Weise wirkt, ist Erythropoietin (48).

So hat dieses Hormon bereits eine Hemmung der Apoptose und somit der Verkleinerung des insgesamt untergegangenen Areal auf dem Gebiet des apoplektischen Insultes unter Beweis gestellt (49).

## **1.2 Erythropoietin**

### **1.2.1 Biochemie und Physiologie**

165 Aminosäuren bilden das 30kDa große Protein Erythropoietin (EPO). Es besitzt 4 Carbohydrat-Seitenketten. Es wird beim Fötus vor allem in der Leber gebildet. Nach der Geburt ist der Hauptproduktionsort die Niere (peritubuläre Zellen) und nur noch zu einem geringen Teil die Leber. Im Herz konnte bisher keine Produktion von EPO nachgewiesen werden.

Ein starker Trigger für die Produktion des Hormons ist die Hypoxie. So steigt die Menge an zirkulierendem EPO exponentiell zur Abnahme des oxygenierten Hämoglobins. Die Aktivierung des für EPO codierenden Gens erfolgt  $pO_2$  abhängig (50,51). Durch reaktive mitochondriale Sauerstoffmetabolite werden oxygenierte Zellen für Proteine sensibilisiert, die eine gesteigerte Expression des EPO Gens induzieren können. Wichtigstes Protein, das eine vermehrte Expression von EPO induzieren kann, ist Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) (52). HIF-1 ist ein heterodimeres Protein mit alpha- und beta-Untereinheiten und gehört zur Familie der basic helix loop helix Per-ARNT-Sim Proteine (bHLH-PAS). HIF-1 alpha kann, obwohl es wie HIF-1 beta translatiert wird, in oxygenierten Zellen nicht nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von  $O_2$  kann HIF-1 alpha, katalysiert von spezifischen Prolyl-4-Hydroxylasen (HIF-PHD), hydroxyliert werden. Das hydroxylierte Protein kann zusammen mit dem von Hippel-Lindau-Tumor-suppressor-Protein einen Komplex eingehen, der dann proteosomal degradiert wird. HIF-PHD spielt somit eine große Rolle bei der Kontrolle der EPO-Produktion, da es verhindert, dass unter normoxischen Bedingungen HIF-1 alpha in den Zellkern gelangt. PHD-2 und -3 sind ebenfalls Targets von HIF-1 alpha, was erklärt, dass bei chronischer Hypoxie die EPO-Spiegel wieder sinken, da bei erhöhten HIF 1 alpha Spiegeln PHD-3 hochreguliert wird. Dadurch sinkt der Anteil an

freiem HIF-1 alpha, welches in den Zellkern gelangen kann (53). Gelangt HIF-1 alpha in den Zellkern, bindet es an einen Liganden und vermittelt so die Translation und schließlich die Freisetzung von EPO (51,54). Das so freigesetzte Protein zirkuliert dann zum Knochenmark, wo es an seine Rezeptoren (EPO-R) und den Beta common Rezeptor bindet. Hierdurch werden erythropoetische Vorläuferzellen mobilisiert und aktiviert. Auch gehen weniger der Zellen in die Apoptose, was ebenfalls zu einer gesteigerten Erythropoese führt.

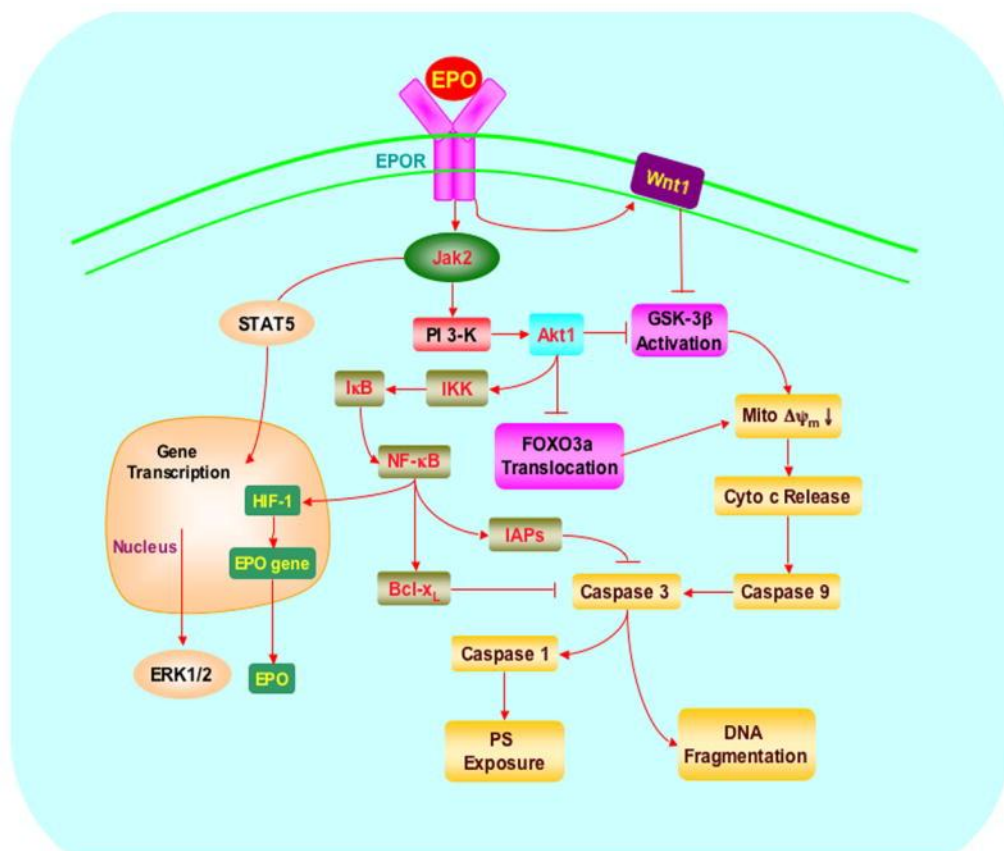


Abb. 1:

Signalwege, die durch den EPO-Rezeptor EPOR im Kardiomyozyten aktiviert werden. Insbesondere der PI3K-AKT Signalweg ist für die Ischämie-Reperfusion des Herzens als RISK-Signalweg (reperfusion-induced-salvage kinase Signalweg) relevant (47), aus Maiese et al (55)

Der EPO Rezeptor findet sich auch extramedullär, wie zum Beispiel in cerebralem Gewebe und im Myokard. Durch Bindung von EPO an diesen Rezeptor dimerisiert dieser und setzt so zelluläre Kaskaden in Gang. PI3/AKT stellt ein wichtiges Target der EPO-vermittelten Wirkung dar. Cai et al. bestätigten dies durch gezielte Inhibition dieses Pathways mit Wortmannin (56,57). Ein Teil dieses Wirkungsverlustes, so

konnte durch Miki gezeigt werden, kann durch eine ERK abhängige Vermittlung kompensiert werden (58). Auch andere Kaskaden, wie die Januskinase 2 (Jak2) und die "signal transducing and activators of transcription 5" (STAT5) werden nach Dimerisation des EPO-R phosphoryliert und so aktiviert. Ebenfalls spielen RAS, RAC und MAPK eine Rolle bei der Vermittlung der EPO Wirkung (59) (vgl. Abbildung 1). Abgesehen von der erythropoetischen Wirkung legt die extramedulläre Existenz von EPO-R (60) nahe, dass weitere Effekte in anderen Organen vorhanden sind. Dies wurde zuerst in humanen Nabelvenen Endothelzellkulturen nachgewiesen (61,62). EPO stimuliert das Wachstum und die Mobilität der Endothelzellen. Dem vaskulären Wirkungsbereich ist sicher auch die Förderung der Produktion von vasoaktiven Substanzen (63) sowie die Initiierung der Neovaskularisation zuzuordnen (64). Des Weiteren beeinflusst EPO die glatten Muskelzellen der Gefäße, indem es zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzt und somit die Kontraktilität erhöht. Phospholipase C und Protooncogene in diesen Zellen werden aktiviert bzw. freigesetzt. Somit scheint EPO ein Wachstumsfaktor für die vaskulären glatten Muskelzellen zu sein (65,66). Im zentralen Nervensystem werden EPO und EPO-R fünf Wochen nach Konzeption nachweisbar. EPO-R wird von Neuronen, Astrozyten und endothelialen Zellen der Kapillaren im ZNS exprimiert (67-69). EPO zeigt in mehreren Studien neuroprotektive und neurotrophe Effekte (68). So schützt EPO hippocampale Neuronen vor dem Glutamat-induziertem Zelltod (70).

Neben dem bereits erwähnten Rezeptor EPO-R existiert noch der Beta Common Rezeptor ( $\beta\text{cR}$ ), der ebenfalls durch das Protein aktivierbar ist. Dieser Rezeptor scheint im Gegensatz zu EPO-R keine hämatopoetischen Eigenschaften zu mediieren, sondern ausschließlich gewebeprotective Eigenschaften zu vermitteln (71). Hinweise hierfür werden durch EPO-Derivate gefunden, die sehr wohl gewebsprotectiv sind, jedoch nicht erythropoetisch.  $\beta\text{cR}$ -knockout-Mäuse weisen eine normale Erythropoese auf (71).

Die vielen Reaktionspartner für EPO-R mögen Ursache der vielen verschiedenen Wirkungen von EPO sein. Diese sind physiologischerweise, wie erwähnt der  $\beta\text{cR}$ , die signalübertragende Untereinheit des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor und der Interleukin-3 und -5 Rezeptoren (71).



### 1.2.2 Anwendungen und Entwicklung

Die Idee einer hormonellen Regulation der Hämatopoese wird zuerst von Paul Carnot 1906 schriftlich fixiert (51). Er schließt auf einen hämatopoetischen Faktor und nennt diesen „Hematopoietin“. Der Begriff wird 1948 von den Finninnen Eva Bonsdoff und Eva Jalavista durch Erythropoietin ersetzt (51). 1977 wird natives humanes EPO erstmalig isoliert. 1985 wird das codierende Gen zum ersten Mal geklont (51). Das Protein wird bei Patienten mit Anämie bzw. chronischem Nierenversagen eingesetzt. Bevor EPO in relevanten Mengen für den klinischen Einsatz vorhanden war, wurden solche Patienten mit Kobalt behandelt, das ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil aufwies. Weitere Versuche bei chronisch Nierenerkrankten mit Androgenen und LH konnten die Erwartungen nicht erfüllen. Die erythropoetische Wirkung von EPO wird zuerst von Oliva et al. 1949 nachgewiesen. Vor 20 Jahren wird von Eschbach der erste Fallbericht veröffentlicht, der die Wirksamkeit von EPO bei chronischem Nierenversagen belegt. EPO erhöht den Hämatokrit, behebt den hyperdynamen Status des Herzens und kann die Progression des Nierenversagens verlangsamen (72).

Auch die Neuroprotektion ist experimentell gesichert und wird derzeit in klinischen Studien überprüft. Ehrenreich et al. führten eine Doppelblindstudie mit 40 Apoplex-Patienten durch (73). Der Trend zeigt hier eine Reduktion der Infarktgröße und letztendlich auch eine verbesserte neurologische Erholung (73). Patienten mit Schizophrenie profitieren ebenfalls von der EPO Gabe. Dies zeigt sich durch verbesserte kognitive Fähigkeiten (74).

Untersucht wurde EPO auch im Zusammenhang mit Tumoren. Die pleiotrophen Effekte des Proteins würden nahe legen, dass maligne Zellen durchaus von dem Protein profitieren (75). Ein Anhaltspunkt dafür könnte das Vorhandensein von EPO-R mRNA in Brust- (76), Lungen- (77,78), Nierenzell- (78), Cervix- und anderen Karzinomen des weiblichen Reproduktionstraktes sein (79). In vitro verändert sich das Überleben der malignen Zellen jedoch nur bei sehr hohen EPO Dosen, die in Patienten niemals erreicht würden. So fehlt bis jetzt noch die Evidenz für einen Zusammenhang zwischen EPO-R Expression und EPO mit dem Tumorwachstum. In Verbindung mit Zytostatika wird deutlich, wie kontrovers sich die Sachlage darstellt. Liu et al beschreiben, dass EPO Tumorzellen vor einem zytotoxischen Effekt schützt

(80). Genauso gibt es jedoch auch Berichte, dass EPO in Verbindung mit Daunorubicin eine höhere Wirksamkeit im Nierenzellkarzinom erzielt (81,82). Die abschließende Klärung dieser Zusammenhänge ist Gegenstand aktueller Studien.

### **1.3 Embryonale endotheliale Progenitorzellen**

Die Stammzelltherapie bei kardialen ischämischen Erkrankungen scheint eine vielversprechende Therapieoption zur Behandlung des ACS zu sein. Es ist bekannt, dass das Herz über Regenerationsmechanismen verfügt, die durch Stammzellen positiv beeinflusst werden können. Dieser Eigenschaft liegen mehrere Wirkmechanismen auf verschiedenen Ebenen zugrunde. Zum einen kann ein direkter protektiver Effekt auf die Myozyten konstatiert werden. Zum anderen werden durch parakrine Aktivität zum Beispiel die leukozytäre Infiltration, die Neovaskularisierung und die strukturelle Erneuerung nach einem ischämischen Ereignis positiv beeinflusst (83,84).

### **Biochemie und Physiologie**

Grundsätzlich werden zwei Typen von Stammzellen unterschieden: Embryonale und adulte. Die adulten können weiter in drei Gruppen eingeteilt werden: im Knochenmark residierende Stammzellen, zirkulierende Vorläuferzellen (aus dem Knochenmark und anderen Organen stammend) und gewebsständige Stammzellen.

Das Knochenmark enthält mehrere Subpopulationen von Vorläuferzellen. So sind hier zum einen die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sogenannten Seitpopulationen, und die mesenchymalen Zellen zu nennen (85,86). Eine Untergruppe der mesenchymalen Zellen stellen die multipotenten adulten Progenitorzellen, zu denen auch die endothelialen Progenitorzellen gehören, dar (87). Gerade diese scheinen bei Reparaturvorgängen nach Ischämie-Reperfusion eine wichtige Rolle zu spielen.

Während der Suche nach angiogenetischen Zellen für eine therapeutische Angiogenese wurde eine Gruppe von zirkulierenden Stammzellen im Blut entdeckt. Asahara et al. nannten diese Zellen endotheliale Progenitorzellen (88). Diese waren charakterisiert durch Expression von hämatopoetischen Stammzellmarkern CD 133

und CD 34 sowie dem endothelialen Marker VEGF Receptor 2. Die so charakterisierten Zellen zeichnen sich durch das Potential aus in ischämischen Gebieten die Neovaskularisierung zu steigern und neue Blutgefäße zu bilden (83).

Stammzellen sind in der Lage, die Anzahl von Kapillaren im ischämischen Areal deutlich zu erhöhen (89). Mittels parakriner Effekte der EPCs können Apoptose reduziert und stationäre kardiale Stammzellen aktiviert werden. In diesem Zusammenhang spielen VEGF, SDF-1 und IGF-1 eine maßgebliche Rolle (99). Infundierte mesenchymale Zellen aktivieren stationäre kardiale Stammzellen und verbessern so endogene Reparaturvorgänge (84).

Durch Zelluntergang wird nach einem ischämischen Ereignis eine Immunantwort getriggert. Eine überschießende entzündliche Reaktion vergrößert das geschädigte Areal. Mesenchymale Stammzellen können diese Immunantwort mitigieren bzw. modulieren.

Embryonale EPCs, wie in dieser Arbeit verwendet, weisen ähnliche protektive Eigenschaften wie die adulten Stammzellen auf. Adulten Stammzellen fehlen pluri-potente Eigenschaften, was durch ein Fehlen von Oct-4 nachweisbar ist.  $\beta$ -Integrine und MHC I Moleküle werden von diesen Zellen nicht exprimiert. Das Fehlen der MHC Moleküle erklärt auch ein zumindest temporär nachweisbares Immunprivileg dieser Zellen (90). Diese Zellen sind in der Lage selektiv in ein ischämisches Gebiet einzuwandern. Dies geschieht durch SDF 1 und seinen Rezeptor CXCR4 (CXC chemokine receptor 4), den E-Selektin-Liganden ESL und den P-Selektin-Liganden PSGL-1 (91,92). Der CXCR4 scheint unter anderem maßgeblich für die zielgerichtete Migration als auch für das angiogenetische Potential der EPCs verantwortlich zu sein (93,94). Durch Hemmung des Rezeptors wird nicht nur die Bewegung auf SDF-1 gemindert, es werden auch weniger Zellen bei einer Ischämie induzierten Neovaskularisierung beteiligt (94).

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Sowohl endotheliale Progenitorzellen als auch Erythropoietin haben ein zytoprotektives Potential. So ergibt sich für diese Arbeit folgende Fragestellung:

1. Kann durch eine Erythropoietin-Einmalgabe ein akuter kardioprotektiver Effekt erreicht werden?
2. Kann durch die Koapplikation von Erythropoietin und eEPCs im Mausmodell ein additiver kardioprotektiver Effekt erreicht werden?
3. Hat Erythropoietin einen akuten kardioprotektiven Effekt bei retrograder Applikation ohne die Mobilisation von Zellen aus dem Knochenmark bzw. ohne die Erhöhung des Hämatokrits ?
4. Ist der kardioprotektive Effekt mit dem der endothelialen Progenitorzellen vergleichbar ?

## **2 Methoden**

Im Folgenden werden die Methoden und andere Materialien vorgestellt, die für die Beantwortung der in der Einleitung erwähnten Fragestellung geeignet scheinen.

### **2.1 In vitro Versuche**

Im ersten Abschnitt soll die Methodik der in vitro Versuche erläutert werden. Diese beinhalten die Myozytenapoptose in der Hypoxiekammer und die Adhäsionsversuche in der Ibidi® Flusskammer.

#### **2.1.1 Myozytenapoptose**

Für diesen Versuch werden Myozyten von drei Tage alten Wistar-Ratten (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) präpariert (95). Nach zwei Tagen werden diese Zellen für vier Stunden in eine Hypoxie-Kammer gelegt (Billups Rothenberg, California, USA). Zum Erreichen einer Hypoxie wird 95%iges Stickstoffgas in die Kammer eingeleitet.

Nach einer Stunde Reoxygenierung saugt man das Medium ab und spült die Platte mit PBS. Die Herzmuskelzellen färbt man mit Trypanblau, anschließend mikroskopiert (Zeiss, Jena, Germany, Axiovert 100), photographiert und zählt man sie. Es werden 40x Vergrößerungen und 10x Vergrößerungen angefertigt. Es wird der Anteil der vitalen Zellen gegen den der apoptotischen verglichen.

Es werden insgesamt fünf Gruppen gebildet. Eine Gruppe wird unbehandelt der Hypoxie/Reoxygenierung unterzogen (n=5). In der zweiten Gruppe (n=5) werden 500.000 embryonale epitheliale Progenitorzellen unmittelbar vor Hypoxiebeginn zugegeben. Diese werden zuvor in einem permeablen Einsatz (Biocoat, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) kultiviert, der auf die Myozytenplatten aufgesetzt wird. Der Einsatz wird bis zum Ende der Reoxygenierung belassen. Die Zellen werden nach Hatzopoulos et al gewonnen (90). Hierfür werden am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung Zellen aus den Vascular Bodies von transgenen Mäusen

isoliert. Die Tiere tragen ein  $\beta$ -Galaktosidase Gen mit einem Thrombomodulinpromotor. Die so gewonnen  $\beta$ -Galaktosidase positiven Zellen werden auf mit embryonalen Mausfibroblasten (feeder cells) beschichteten Platten kultiviert. X-Gal färbt die embryonalen, endothelialen Progenitorzellen blau. Diese werden nun isoliert und expandiert. In Zellkultur sind die eEPCs ohne Veränderung des Phänotyps kultivierbar.

In der dritten Gruppe werden 15 IE Erythropoietin unmittelbar vor der Hypoxie dem Medium zugegeben (n=5). Die Substanz kann bis zum Ende der Reoxygenierung wirken.

In der vierten Gruppe werden 15 IE Erythropoietin zu Beginn der Reoxygenierung gegeben und für die Dauer derselben belassen (n=5).

In der fünften Gruppe werden vor der Hypoxie eEPCs und Erythropoietin (n=5) in den erwähnten Dosierungen verabreicht. Dies geschieht wie bereits in Gruppe zwei und drei beschrieben.

### **2.1.2 Adhaesionsversuche**

Die Versuche werden mit Ibidi©  $\mu$ -Slides I (Vitaris AG, Baar, Germany) (IbidiTreat ge-coated mit Fibronectin) Durchflusssystemen durchgeführt.

Kaninchen-Endothelzellen bedecken die Oberfläche der Slides und sind einen Tag vorher gemeinsam mit den Kammern in einem Inkubator äquili-briert. 100 $\mu$ l Kaninchen-Endothelzellsuspension wird in den Flusskanal, 600 $\mu$ l zellfreie Suspension in das Reservoir gegeben. Die Reservoirdeckel setzt man lose auf. Bei 37 Grad bildet sich nach 2-3 Tagen ein geschlossener Zellrasen. Die Endothelzellen werden durch Zugabe von LPS (1ng/100 $\mu$ l) oxidativem Stress ausgesetzt. Nach eben dieser Vorbereitung erfolgt die Perfusion der Kammern mit eEPCs. Die Kammern werden einmal mit unbehandelten eEPCs (n=3), einmal 24 Stunden mit 20 IE EPO inkubierten eEPCs (n=3) perfundiert. Als Positivkontrolle dienen transient p65pcDNA transfizierte eEPCs (n=3).

Die eEPCs werden wie beschrieben nach Hatzopoulos et al (90) gewonnen und entstammen der selben Kultur wie die bereits erwähnten. Die Stammzellen sind mit Dil (Molecular probes®, Life technologies, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und auf

200.000/ml verdünnt. Dil färbt selektiv embryonale Stammzellen. Mit einer Förderrate von 8ml/h werden die Kammern perfundiert und anschließend mit PBS (4ml, Förderrate 12ml/h) gewaschen. Die gefärbten, adhärenen Zellen können dann fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt werden. Pro Slide werden zehn Gesichtsfelder ausgezählt.

## **2.2 In vivo Versuche**

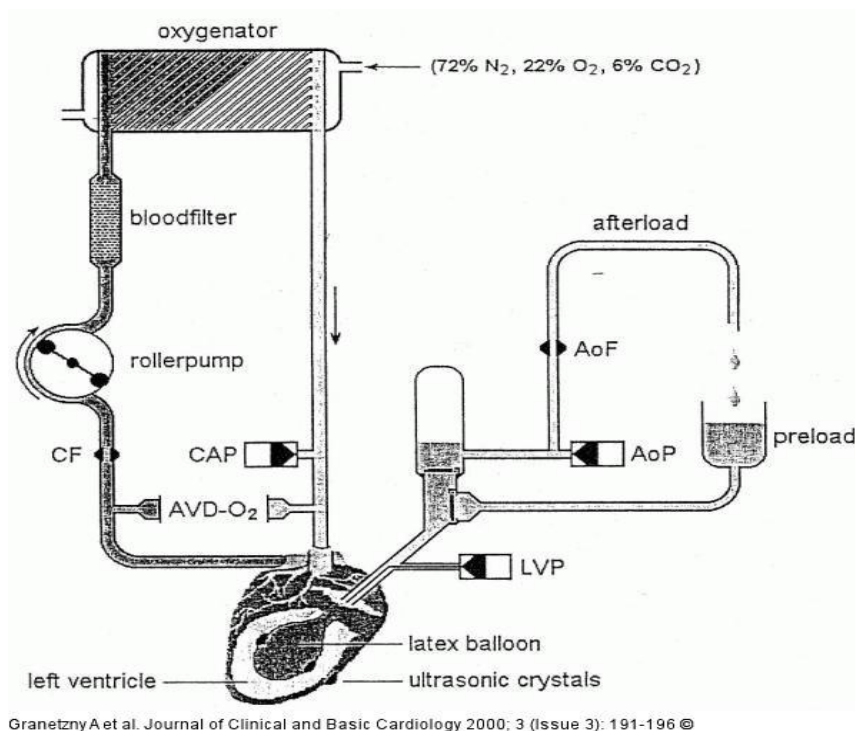
In diesem Abschnitt soll die Methodik der in vivo Versuche erläutert werden. Es wird zum einen mit dem Langendorff Modell (vgl. Abbildung 2) zum anderen im Großtiermodell gearbeitet.

### **2.2.1 Langendorff-Versuch**

Für diesen Versuch werden C57B6 Mäuse (Charles River WIGA (Deutschland) GmbH, Sulzfeld) zwischen 24g und 34g verwendet. Diese werden mit 0,35 mg Ketanest® und 0,05 mg Rompun® intraperitoneal analgosediert. Die Tiere werden gewogen und auf einer schiefen Ebene fixiert.

### **Präparation und Versuch**

Es erfolgt eine Thorakotomie links lateral des Sternums mit Exzision der linken Thoraxwand. Die herznahen Gefäße werden dargestellt und frei präpariert. Anschließend wird eine stumpfe Kanüle mit distaler Einkerbung durch eine Inzision zwischen Truncus brachiocephalicus und Aorta in die Aorta so eingeführt, dass das Herz über die Koronararterien perfundiert ist. Die Kanüle wird mit einem vorgelegten Faden (6-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) fixiert. Das Einbringen der Kanüle dauert nicht länger als 5 Minuten und wird immer mittels Stoppuhr überwacht. Sofort wird frisch oxigenierte Krebs/ Henseleit Lösung ( $\text{CaCl}_2$  2,5mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,2mM, Pyruvat 2,0mM, KCl 3,8mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2mM,  $\text{NaHCO}_3$  15,5mM, Glukose 11,5mM, Mannitol 16mM, NaCl 121,5mM, EDTA 0,05mM) infundiert. Die Lösung wird in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zuvor wird die Lösung mit  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  so equilibriert, dass ein konstanter pH von 7,4 vorherrscht.



**Abb. 2: Langendorff Versuchsaufbau aus Granetzny et al (96)**

Das an der Nadel fixierte Herz wird nun in das Gerät eingebracht. Das Herz wird druckadaptiert mittels Peristaltikpumpe perfundiert (Reglo analog MS-2/6-160, HSE, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) (vgl. Abbildung 2). Das Perfusat wird mittels oben genannter Pumpe durch einen Microfilter (Millex GP-Filter 0,22µm, Millipore, Bedford, MA, USA), dann durch eine Heizspindel geleitet. In einer Luftfalle werden Luftblasen entfernt, so dass der Druck fehlerfrei zwischen Falle und Herz gemessen werden kann (Statham Transducer, BD GmbH). Die Nachlast ist so justiert, dass im linken Ventrikel ein Druck zwischen 60 und 90 mm/Hg herrscht. Nach einer Standardeinschlagphase von 20 Minuten erfolgt dann je nach Versuch eine 20 minütige Ischämie mit anschließender 15 minütiger Reperfusion. Die Ischämie wird durch Umlegen des Dreiwegehahns und der damit verbundenen fehlenden Perfusion der Koronarien simuliert. Die Funktionsüberwachung erfolgt zum einen optisch, zum anderen durch Messung des Drucks in der Aorta. Die Substanzen werden ab Minute eins der Reperfusion über acht Minuten mittels Perfusor (fresenius®, Bad Homburg, Germany) in die zuführende Leitung gegeben. Die Organe werden nach Versuchsende unmittelbar in rechten und linken Ventrikel separiert und anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert.



## **Zugegebene Substanzen**

Es werden 12IE EPO über acht Minuten mittels Perfusor (fresenius®, Bad Homburg, Germany) ab Minute eins Reperfusion (n=2) gegeben.

Die embryonalen endothelialen Progenitor-Zellen werden wie beschrieben nach Hatzopoulos et al (90) gewonnen. Diese Zellen tragen typischerweise frühe endotheliale Marker wie z.B. iNOS, von Willebrand Faktor und VE-Cadherin.

Die eEPCs werden für die Applikation im Versuch mit PBS verdünnt. Um zu untersuchen, ob ein dosisabhängiger Effekt vorliegt werden dann 150.000 (n=2) bzw. 1.000.000 (n=2) Zellen nach der Ischämie analog zu EPO verabreicht. In Gruppe E werden 1.000.000 Zellen und 12IE EPO zusammen infundiert (n=2).

## **Versuchsgruppen**

Die Versuchstiere sind in folgenden Gruppen zusammengefasst (n=2):

- |         |   |
|---------|---|
| Group A | 20 min Einschlagphase, 20 min Ischämie, 15 min Reperfusion  |
| Group B | 20 min Einschlagphase, 20 min Ischämie, 150.000 eEPCs, 15 min Reperfusion                           |
| Group C | 20 min Einschlagphase, 20 min Ischämie, 1.000.000 eEPCs, 15 min Reperfusion                         |
| Group D | 20 min Einschlagphase, 20 min Ischämie, 12IE Erythropoietin, 15 min Reperfusion                     |
| Group E | 20 min Einschlagphase, 20 min Ischämie, 12IE Erythropoietin und 1.000.000 eEPCs, 15 min Reperfusion |

## **2.2.2 Ischämie/Reperfusionsschaden am Schweineherzen in einem Modell des perkutanen akuten Myokardinfarktes**

Im Folgenden sollen nun die im Großtierversuch verwendeten Methoden dargestellt werden. Dieser Abschnitt umfasst zum einen die Vorbereitungen, den Versuchsablauf an Tag eins und an Tag zwei.

### **2.2.2.1 Erster Versuchstag**

#### **Vorbereitung**

Verwendung finden Tiere der Gattung deutsches Hausschwein. Diese werden vor dem Versuch vereinzelt und ihnen wird i. m. folgende standardisierte Narkose in den Nacken verabreicht:

- 1mg Atropin
- Azepromazin (Stresnil©)
- 10mg Ketamin
- 0,2mg Fentanyl©

Nach ausreichender Analgosedierung legt man den Tieren noch im Stall einen peripheren venösen Zugang in eine Ohrvene. Die Narkose wird mittels Midazolam vertieft, man intubiert endotracheal und überwacht mit einem Pulsoxymeter (Nellcor®, Bochum, Deutschland) die periphere Sauerstoffsättigung. Unter Beutelbeatmung erfolgt der zügige Transport in den OP. Auf dem Tisch wird das Tier fixiert, an die maschinelle Beatmung (Siemens® Servo 900, Erlangen) angeschlossen und kontrolliert beatmet. Die Vitalparameter werden mittels EKG (Siemens® medical, Erlangen), Pulsoxymeter (Nellcor®, Bochum) und invasiver arterieller RR-Messung stetig angezeigt. Die Narkose wird mit Propofol© (Fresenius Medical Care Dtl. GmbH, Bad Homburg) und Isoflurane® (Baxter Deutschl. GmbH, Heidelberg) weitergeführt.

Mit einem Elektrokauter inzidiert man über ca. 5 cm die Haut über dem Musculus sternocleidomastoideus. Um die arterielle Schleuse (9 French, Medtronic®, Düsseldorf) zu platzieren, wird am medialen Rand des Musculus sternocleidomastoi-

deus nach dorsal präpariert. Die Arteria carotis communis wird dargestellt, cranial abgebunden und distal mit einer Ligatur umschlungen. Mit einer kleinen Schere schneidet man das Gefäß ein. Durch Zug an der kaudalen Ligatur verschließt man die Arterie temporär, so dass der Führungsdraht ohne Blutverlust eingeführt werden kann. Die Schleuse wird eingeführt und mittels Ligaturen fixiert. Die RR- Messung wird geeicht und angeschlossen (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg). Analog wird auf der venösen Seite mit einer 11 French Schleuse (Medtronic®, Düsseldorf) verfahren. Über die venöse Schleuse infundiert man NaCl 0,9% (2ml/kg/Stunde), 80mg Amiodaron®, 10 mg  $Mg^{2+}$  und bei Bedarf Haes 6%. Das Propofol® wird mit einer Flussrate zwischen 4 ml/h und 8ml/h kontinuierlich appliziert. Es werden 10.000IE Heparin verabreicht.

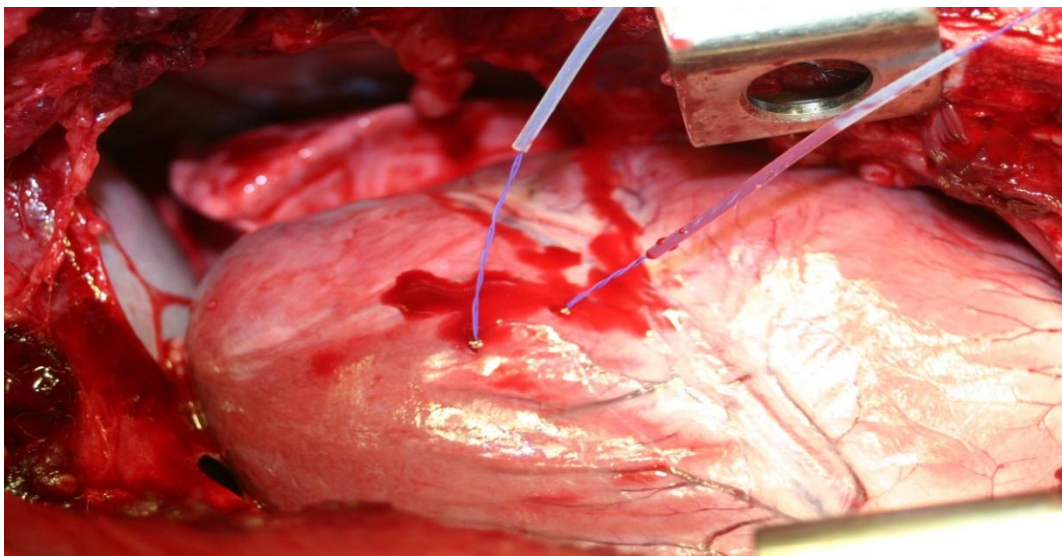
## **Versuch**

Über die arterielle Schleuse wird der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) bzw. der linksventrikuläre Druck (LVP) mittels eines Pigtailkatheters (Cordis®, Reading, Miami, USA) aufgezeichnet.

Die venöse Schleuse verwendet man dazu, über einen Concord® Katheter einen 18er Draht (Cordis®, Reading, Miami, USA) in der abführenden Koronarvene zu platzieren. Der Concord® Katheter wird nach Lagekontrolle durch einen SSR® Katheter ersetzt. Einen 7 French Judkins rechts® Katheter mit Slideholds versieht man mit einem Y-Stück und führt ihn über die arterielle Schleuse ein. Einen 14er Draht (Cordis®, Reading, Miami, USA) schiebt man in die LAD vor, um dann hier distal des ersten diagonalen Astes mittels eines aufblasbaren Ballons die Ischämie zu induzieren. Den 3.0 x 12mm Ballon platziert man wie oben beschrieben und blockt ihn mit 6 atm Druck. Der so herbeigeführte Infarkt wird für 60 Minuten aufrechterhalten. In Minute 55 der Ischämie beginnt man mit der retrograden Infusion mittels SSR-Infusomaten. Man appliziert 20.000 IE EPO bzw. 5 Mio eEPCs in PBS über 10 Minuten. Die Kontrollgruppe wird nicht therapiert. Das Tier erhält i.v. 750mg Cefuroxim als Infektprophylaxe. Ein kleines Blutbild wird entnommen und sofort ausgewertet. Die Katheter werden entfernt, die Gefäße ligiert und der Schnitt schichtweise verschlossen. Ein Guedeltubus hält die Atemwege in der Aufwachphase offen.

### 2.2.2.2 Zweiter Versuchstag

Mit Narkose und Schleusen wird wie an Tag eins verfahren. Man führt einen Pacer (Siemens medical®, Erlangen) über den venösen Schenkel ein. Ein Conductance-katheter wird über den arteriellen Zugangsweg positioniert und es werden Messungen der globalen Myokardfunktion durchgeführt (LVEDP). Anschließend appliziert man 2 ml Pancuronium® und 0,2 mg pro kg KG Fentanyl® als Vorbereitung für die Thorakotomie. Wie an Tag eins wird Blut für ein kleines Blutbild entnommen und ausgewertet. Für die Thorakotomie wird das Sternum freipräpariert und in der Mittellinie gespalten. Das Perikard wird median eröffnet. Durch kleine ca. 2 mm lange Schnitte werden Ultraschallkristalle im Myokard verankert. Hierbei handelt es sich um Piezo-Kristalle (vgl. Abbildung 3), die jeweils als Sender und Empfänger fungieren und somit eine Berechnung der myokardialen Segmentverkürzung ermöglichen. Als Referenzregion dient ein nicht ischämes Areal im Versorgungsgebiet des Ramus circumflexus.



**Abb. 3: Sonomicrometrikristalle**

Mit dieser Methode wird das gesunde Myokard, die area at risc (AAR) und das Infarktareal vermessen. Um die Funktion auch unter Stress darzustellen, visualisiert man die Abstände bei Baseline, gepaceten 80, 100, 120, 140 und 160 Schlägen pro Minute. Methylenblau wird in den linken Ventrikel eingespritzt, um vitales Gewebe zu färben. Mit gesättigter Kaliumchlorid Lösung wird das Tier anschließend euthana-

siert und das Herz entnommen. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) werden Areale mit intakter Atmungskette sichtbar. Man appliziert TTC in den durch Umstechung abgedichteten Ramus interventrikularis anterior. Fünf transversale Schnitte werden angefertigt und abfotografiert und später planimenterisch analysiert. Für histochemische und molekularbiologische Untersuchungen werden Gewebeproben aus dem ischämischen und nicht-ischämischen Areal entnommen und kryokonserviert.

## **2.3 Auswertung der in vivo Versuche**

Im nächsten Abschnitt werden die Methoden geschildert, die zur Gewinnung der Ergebnisse aus dem Langendorff- und Großtierversuch verwendet wurden.

### **2.3.1 Western Blots**

Um den Grad der Aktivierung des AKT pathways darzustellen, wird eine Western Blot Analyse durchgeführt.

#### **Vorbereitung**

Proben:

Das bei minus 80 Grad tiefgefrorene Herzgewebe wird gewogen und mit einem Ultraturrax® (Ika industries, Germany) unter Zugabe von 1 ml Puffer A zerkleinert.

Durch ein Netz wird das Lysat in 1,5 ml Eppendorfgefäß pipetiert (Siebgewebe Polyamid 100 µm Porengröße, Neolab, Heidelberg, Germany) und fünf Sekunden bei 14.000 Umdrehungen zentrifugiert. Den Überstand füllt man in ein neues Eppendorfgefäß um und zentrifugiert dies wiederum bei 14.000 Umdrehungen pro Minute und bei 4 Grad für 20 min. Das Cytosol (Überstand) aliquotiert man in 6 Eppendorfgefäße à 100 µl. Eines davon wird dann zur Proteinmessung verwendet. Den Proteingehalt bestimmt man photometrisch und verdünnt es mit Puffer A auf 15 µl. 3 µl Lämmli-puffer werden dann dem Gemisch zugesetzt (vgl. Anlage 1, Tabelle 1). Abschließend erhitzt man die Proben für zehn Minuten auf 95 Grad.

Die Platten (Bio rad Laboratories, München, Germany) werden gereinigt und in der

vorgesehenen Halterung fixiert. Die Gels bereitet man folgendermaßen vor:  
Zuerst wird das 10% Gel (vgl. Anlage 1, Tabelle 3) zwischen Glas- und Metallplatte gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um einen glatten oberen Rand zu erhalten. Nach einer kurzen Trocknungszeit gießt man den Alkohol ab und spült den freiwerdenden Raum mit destilliertem Wasser. Nun füllt man das 4%ige loading Gel (vgl. Anlage 1, Tabelle 2) so ein, dass der Platz bis zum Ende der Platten ausgefüllt wird. Zügig setzt man den Kamm ein. So vorbereitet wird alles in die mit Running-Buffer (vgl. Anlage 1, Tabelle 4) befüllte Laufkammer (Bio rad Laboratories, München, Germany) eingesetzt. Der Kamm wird vorsichtig entfernt.

### **Durchführung**

Die wie oben beschriebenen vorbereiteten Proben werden in die Gelkammern pipetiert und die Apparatur mit dem Deckel verschlossen.

Dann schließt man eine Spannung von 95 V für 10 Minuten an. Nach dieser Zeit erhöht man die Spannung auf 130-135 V. Die Laufzeit beendet man zu dem Zeitpunkt, zu dem sich der blaue Farbstoff bis auf 0,5 cm der Unterkannte angenähert hat.

Das Gel wird nun vorsichtig, von Blotting Buffer (vgl. Anlage 1, Tabelle 5) umspült, von den Platten abgelöst.

Es wird auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Diese Membran ist vorher 10 Sekunden in Methanol eingelegt. Der Gel-Zelluloseverbund wird nun zwischen Papierfliese und Schwämmchen in das Blottinggitter eingespannt. In der Blottingkammer fixiert man darauf die Proteine bei 80 V für 90 bis 110 Minuten auf der Membran.

Dann entnimmt man die Membran und löst das Gel vorsichtig ab. Nach kurzem Waschen mit PBS wird in 5% Milch in PBS-T der Versuchsträger fixiert. Der erste Antikörper (AKT: AKT goat polyklonal; pAKT: pAKT rabbit polyklonal (Santa Cruz biotechnology® Heidelberg, Germany)) wird in Milch verdünnt aufgetragen. Der Ansatz bleibt bei 4 °C über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wäscht man die Zellulose 2x 10 Minuten in PBS und 0,1% Tween. Eine Stunde belässt man den zweiten Antikörper (AKT: donkey anti goat polyklonal IgG HRP, pAKT: goat anti rabbit polyklonal IgG HRP, (Santa Cruz biotechnology® Heidelberg, Germany)) in 5% BSA bei Raumtemperatur auf dem Blot. Zwei mal 10 Minuten wird in PBS und 0,1% Tween, dann einmal nur in PBS gewaschen. ECL (Amersham Pharmacia

Biotech Europe GmbH, Nürmbrecht, Germany) mischt man zu gleichen Teilen und wäscht es nach einer Minute wieder ab. Diese Chemolumineszenz bindet selektiv an die Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase /HRP) konjugierten Antikörper. Abschließend erfolgt die Visualisierung durch einen lichtempfindlichen Film.

### **2.3.2 Myeloperoxidase**

Als Indikator für die leukozytäre Infiltration von Gewebe dient die Myeloperoxidase (97). Die Messung der Myeloperoxidase wird nach Xia und Zweier durchgeführt (98).

#### **Vorbereitung:**

Die Puffer werden wie in Anlage 1 dargestellt vorbereitet. (vgl. Anlage 1, Tabelle 6-8)

#### **Gewebepräparation:**

Hierfür werden 150 mg Gewebe abgewogen, 3 ml 50mM Phosphatpuffer pH 6,0 und 0,5% Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) zugegeben und die Substanzen mit dem Ultra turrax® (Ika industries, Germany) zerkleinert. Diese Mischung behandelt man zehn Sekunden mit Ultraschall. Nach dreimaligem Einfrieren (-80 Grad) und Wiederauftauen (Raumtemperatur) wird das Lysat wiederum zehn Sekunden Ultraschall ausgesetzt. 30 Minuten zentrifugiert man dann bei 15 °C und 40.000g (UZ Beckmann, TI 60-Rotor, 20000 rpm). 100µl des Überstandes können darauf in die MPO Messung eingesetzt werden.

#### **Messung**

100µl der Proben werden mit 2,9 ml 50mM Phosphatpuffer (vgl. Anlage 1, Fig.8) pH 6,0 0,53mM O-Dianisidin (z.B. 10 ml Phosphatpuffer, 1,68 mg O-Dianisidin, 15µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in eine Mikroküvette pipettiert. Dieses Lysat vermisst man dann nach genau 20 Minuten bei einer Wellenlänge von 460 nm photometrisch. (Kontrolle: (n=4); eEPCs: (n=4); EPO: (n=3))

### **2.3.3 Histologische Auswertung**

Nach Euthanasie des Schweines durch intraventrikuläre Applikation von Kaliumchlorid und nach Applikation von TTC in die LAD werden fünf transversale Schnitte angefertigt. Die Schnitte fotografiert und planimetriert man dann mit Microsoft Photoshop. Die Infarktfläche und die AAR misst man mittels Microsoft Photoshop aus. Sie unterscheiden sich durch farbliche Unterschiede nach TTC Färbung. Es wird dann zum einen das Infarktareal im Verhältnis zur AAR in Prozent angegeben, zum anderen die AAR im Verhältnis zum linken Ventrikel. (Kontrolle: (n=6); eEPCs: (n=7); EPO: (n=3))

## **2.4 Statistik**

Alle aufgeführten Mittelwerte werden mit Standardabweichung ( $\pm$ S.D.) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mittels der Software SPSS (Version 17). Die unterschiedlichen Versuchsgruppen werden bei Normalverteilung der Daten mittels T-Test oder – bei multiplen Gruppenvergleichen - mittels einfaktorieller ANOVA verglichen. Bei nicht normalverteilten Daten - auf Normalverteilung wird mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft - findet der Mann-Whitney-U-Test für die paarweisen Gruppenvergleiche Verwendung. Das Signifikanzniveau wird für  $p < 0,05$  festgelegt.



### **3 Eigene Ergebnisse**

Im folgenden Abschnitt sollen Ergebnisse der selbst durchgeführten Versuche dargestellt werden. Diese dienen zur Klärung der bereits in der Einleitung genannten Fragestellung.

#### **3.1 In vitro**

Im ersten Teil wird an zellulären Modellen untersucht, ob EPO bzw. eEPCs Einfluss auf das Überleben von Myozyten nach Hypoxie und Reoxygenierung haben. Es wird des Weiteren verglichen, ob der Zeitpunkt der Applikation das Ergebnis beeinflusst und ob bei Koapplikation von eEPCs und EPO ein positiver additiver Effekt zu beobachten ist. Gegenstand der Untersuchung in der Zellkultur ist ebenso, ob EPO zu einer vermehrten Adhäsion von Vorläuferzellen an hypoxieexponiertem Endothel führt.

##### **3.1.1 Myozyten**

In der Zellkultur werden neonatale Rattenmyozyten für vier Stunden oxidativem Stress ausgesetzt und anschließend eine Stunde reoxygeniert. Durch die Zugabe von eEPCs und EPO vor bzw. nach Hypoxie für die Dauer der Reoxygenierung wird das Myozytenüberleben im Mittel um das 3,28 fache gegenüber den unbehandelten Zellen verbessert (vgl. Abbildung 4).

So zeigt sich bei der quantitativen Analyse der Daten, dass keine der gegebenen Substanzen den anderen überlegen ist. Sowohl EPO als auch die eEPCs zeigen einen deutlichen zytoprotektiven Effekt. Des Weiteren fällt auf, dass der Zeitpunkt der EPO- Applikation anscheinend keine Rolle spielt. Die Koapplikation von EPO und eEPCs bringt keinen messbaren Vorteil. Insgesamt ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den behandelten Tieren ( $p \leq 0,05$ ): Gruppe 1 gegenüber den Gruppen 2, 3, 4 und 5). Die verschiedenen Therapien unterscheiden sich nicht signifikant. ( $p > 0,05$ )

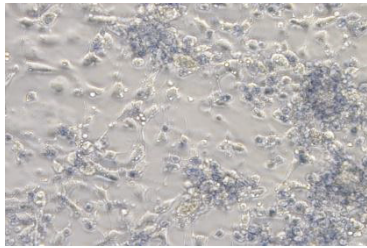


Bild1: Myozyten nativ

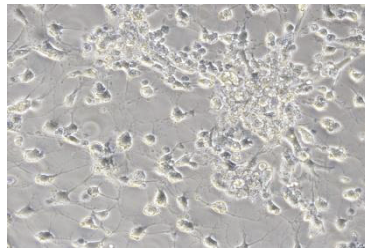


Bild 2: EPO vorher

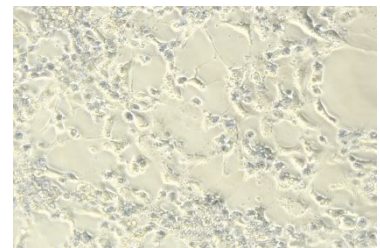
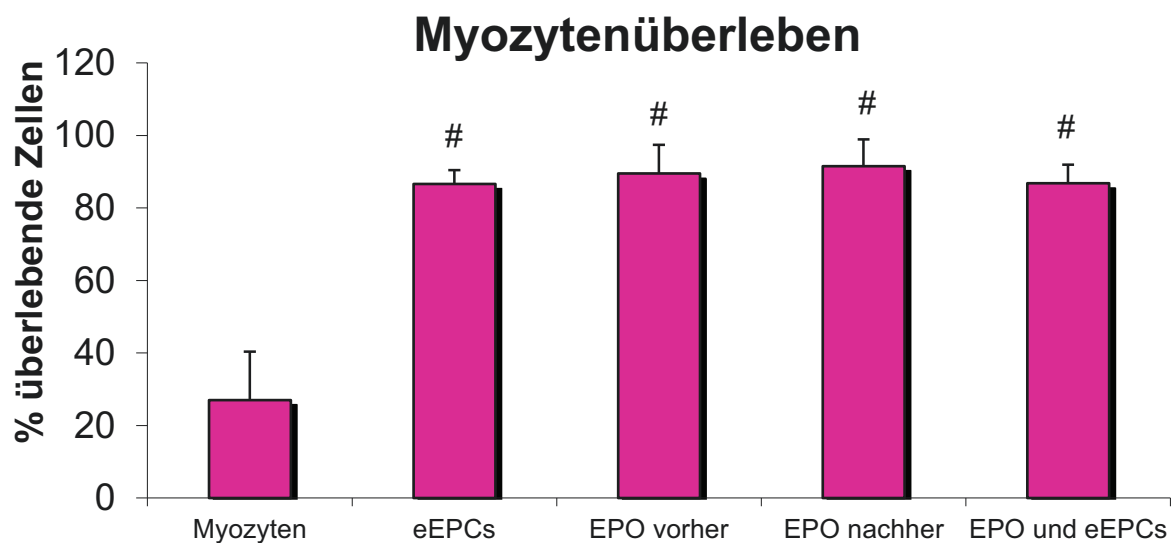


Bild 3: EPCs



(n=5) pro Gruppe; #:  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle;  $p > 0,05$  unter den behandelten Gruppen

**Abb. 4: Hypoxiekammer Myozyten; quantitative Darstellung des Myozytenüberlebens in % nativ, nach Zugabe von 500.000 eEPCs vor Hypoxie, 15IE EPO vor (EPO vorher) und nach (EPO nachher) Hypoxie und nach Zugabe von 500.000 eEPCs und EPO vor Hypoxie**

### 3.1.2 In vitro Adhäsionsversuch

Hierbei wird untersucht, ob Erythropoietin einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der eEPCs hat. Hierfür wird - wie bereits erwähnt - eine mit neonatale Kaninchen-endothelzellen beschichtete Kammer durch eine Lösung perfundiert, in der mit EPO inkubierte eEPCs gelöst sind.

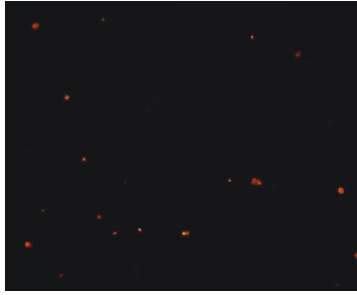


Bild 1: Adh rierende eEPCs

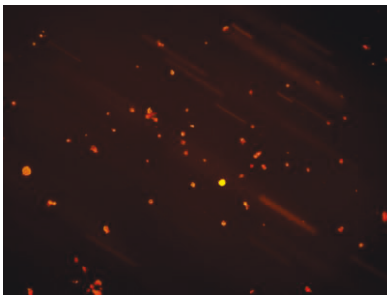
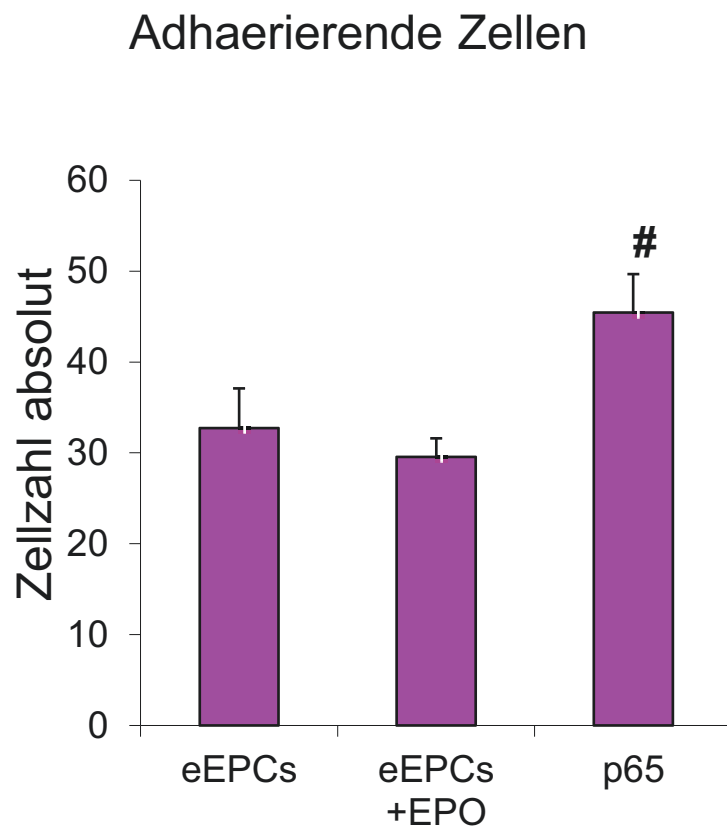


Bild 2: Adh rierende eEPCs (im Fluß)



(n=3); #:  $p < 0,05$  gegenüber eEPCs, eEPCs + EPO

Quantitative Analyse der adhärierenden Zellzahl unter entsprechender Vorbehandlung der Zellen

**Abb. 5: Adhäsion von embryonalen EPCs mit unbehandelten Endothelzellen (eEPCs), mit Erythropoietin inkubierten (eEPCs + EPO) oder mit p65 transient transfizierten Progenitorzellen (p65)**

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass EPO keinen adhäsiven Effekt auf die eEPCs hat. Es stehen 32,7 ( $\pm$  4,4) adhärierte Zellen bei alleiniger eEPC Gabe 29,6 ( $\pm$  2) Zellen bei gemeinsamer Gabe mit EPO gegenüber. Dass das Adhäsionsverhalten jedoch sehr wohl beeinflussbar ist, konnte mit p65pcDNA transient transfizierten eEPCs gezeigt werden, bei welchen im Mittel 45,4 ( $\pm$  4,2) Zellen nach dem Versuch zählbar waren. Ein signifikanter Unterschied besteht hierbei für p65 Gruppe gegenüber eEPCs und eEPCs + EPO (#;  $p < 0,05$ ). Die anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (vgl. Abbildung 5).

## 3.2 In vivo

Bei den in vivo Versuchen wurde zum einen geprüft, in wie weit EPO survival-pathways aktiviert, zum anderen wurden die Organe funktionell und histologisch untersucht.

### 3.2.1 Western Blot

#### 3.2.1.1 Maus

Als Hinweis auf eine Aktivierung der RISK Signalkaskade wird die Zunahme der aktivierten Proteinkinase B im Herzen gemessen. Hierfür werden fünf Tiere pro Blot zusammengefasst. Diese unterscheiden sich in Art und Dosierung der Behandlung.

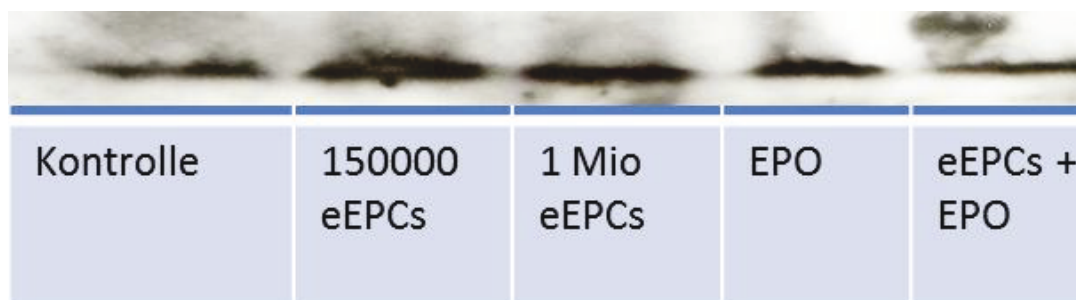
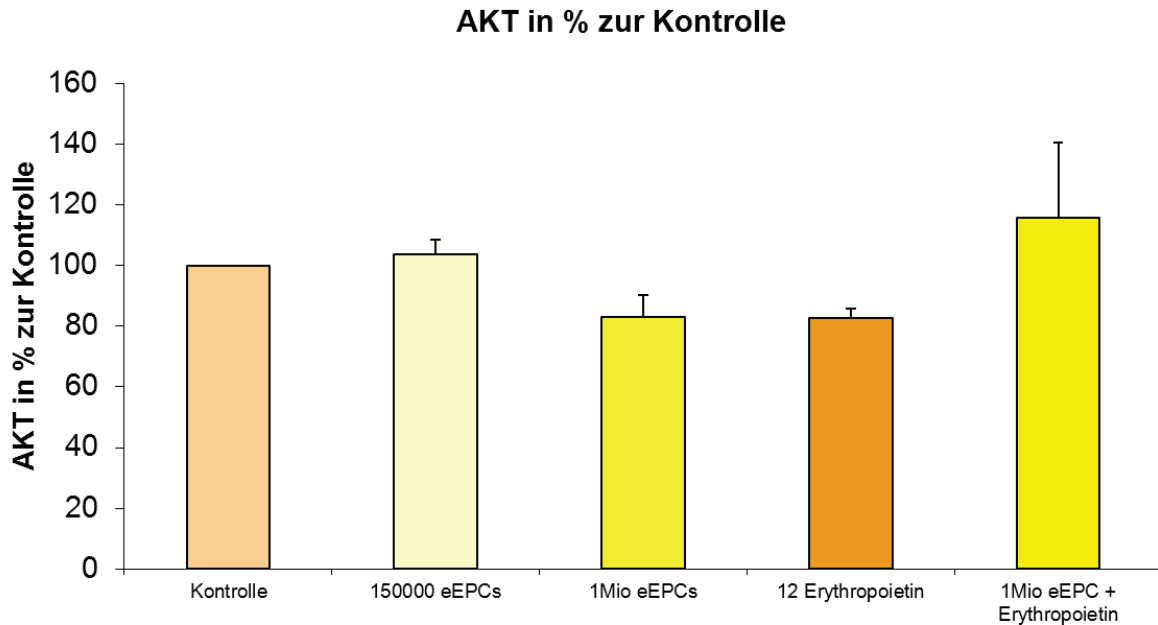


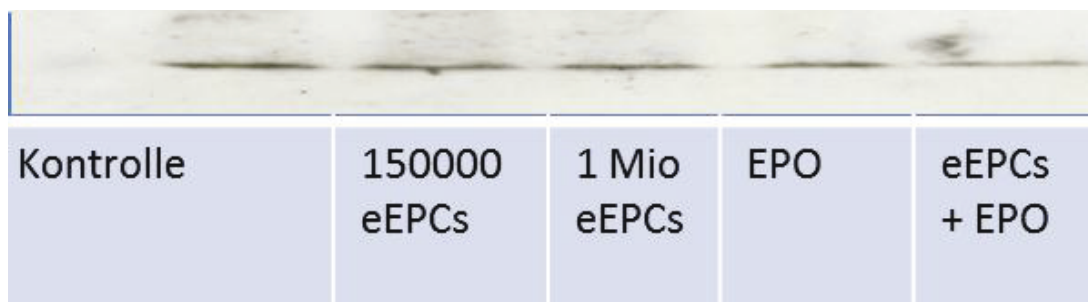
Tabelle 1: AKT-Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin. (n=2)



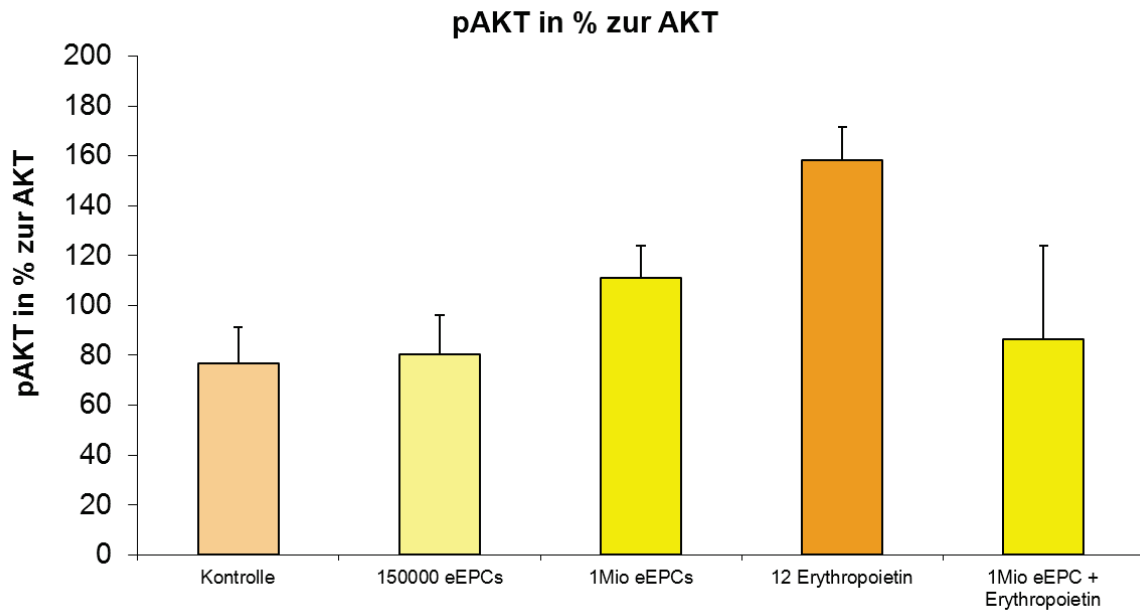
(n=2),  $p > 0,05$  zwischen den Gruppen

**Abb. 6: AKT in% zur Kontrolle: AKT- Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin.**

Als Ausgangspunkt wird die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die anderen Werte werden in Prozent zur Kontrolle dargestellt. Es zeigt sich, dass die Werte für die AKT sehr wohl divergieren. Für die mit 15.000 eEPCs behandelten Tiere wird ein Wert von 105% ( $\pm 6\%$ ) ermittelt. Die mit 1.000.000 eEPCs therapierten Mäuse zeigen mit 71% ( $\pm 17\%$ ) einen geringeren Anteil an Protein als die Kontrolle. EPO bewirkt einen Abfall auf 70% ( $\pm 15\%$ ). eEPCs und EPO liegen mit 104% ( $\pm 6\%$ ) über der Kontrolle. Eine Signifikanz ist hier nicht nachzuweisen ( $p > 0,05$ ). (vgl. Abbildung 6 und Tabelle 1).



**Tabelle 2: pAKT-Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin.(n=2)**



(n=2);  $p > 0,05$  zwischen den Gruppen

**Abb. 7: pAKT in % zur AKT: pAKT- Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin.**

Zentraler Punkt dieser Untersuchung ist das prozentuale Verhältnis von phosphorylierter AKT zur Gesamtmenge AKT. Die Kontrolle (20 Minuten Einschlagphase, Ischämie 20 Minuten, Reperfusion 15 Minuten) ergibt hierbei einen aktivierten Anteil von 77% ( $\pm 10\%$ ). Eine Behandlung des isolierten Herzens mit 15.000 eEPCs ergibt eine Verbesserung auf 80% ( $\pm 10\%$ ). In den beiden Einzelgruppen beträgt die Verbesserung 3 bzw. 4%. 1.000.000 eEPCs ergeben einen prozentualen Anteil von 111% ( $\pm 10\%$ ) im Lysat, 12U EPO sogar 158% ( $\pm 10\%$ ). Die Koapplikation von EPO und eEPCs erreicht diesen Wert nicht: 86% ( $\pm 20\%$ ). Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (vgl. Abb. 7 und Tabelle2).

### 3.2.1.2 AKT im porcinen Herzwesbe

Zur Überprüfung der zellprotektiven Wirkung von EPO wird die aktivierte AKT in Prozent in den verschiedenen Arealen nach 24h Reperfusion gemessen.



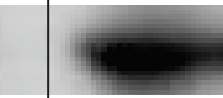

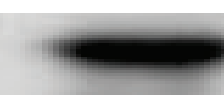
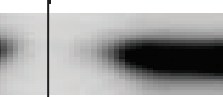
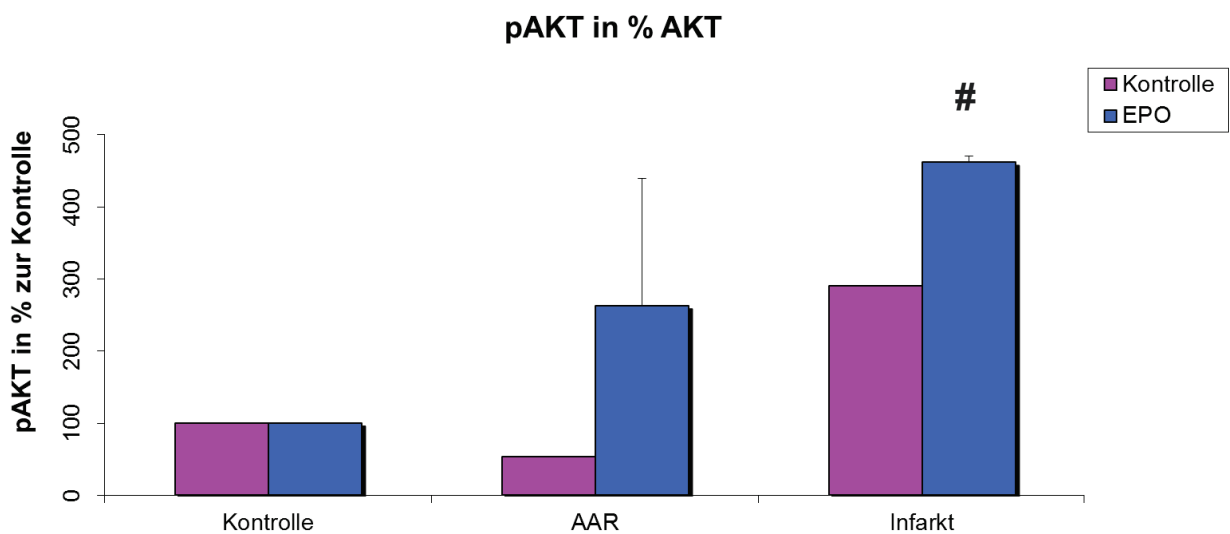
Kontrolle			
EPO			
	Kontrolle	AAR	Infarkt

Abb. 8: pAKT in Prozent zur Kontrolle; (Kontrolle: (n=1); EPO: (n=2))



Kontrolle:(n=1), EPO: (n=2); #:  $p < 0,05$  EPO vs Kontrolle im Infarktareal

Abb. 9: Quantitative Analyse der pAKT in % zur Kontrolle

Die pAKT im Kontrollareal wird mit 100% angegeben. Auf sie beziehen sich die Messungen in der AAR und im Infarktareal.

Bei den behandelten Tieren zeigt sich in der AAR ein deutlicher Anstieg der aktivierten AKT um fast das Dreifache ( $262\% \pm 177$ ). Eine Signifikanz kann in dieser Gruppe nicht gesehen werden ( $p > 0,05$ ).

Noch deutlicher ist die Steigerung in der Infarktzone auf  $462\% (\pm 8,19)$ . Hier ergibt sich eine Signifikanz (#;  $p < 0,05$ ).

In der Kontrolle hingegen zeigt sich im Vergleich zum gesunden Myokard ein Abfall in der AAR um nahezu 50% (54% der pAKT im Kontrollareal). In der Infarktzone ist die pAKT zwar erhöht, erreicht aber mit 290% nicht den Wert der behandelten Tiere. (vgl. Abb. 8 und 9)

### 3.2.1.3 Myeloperoxidase

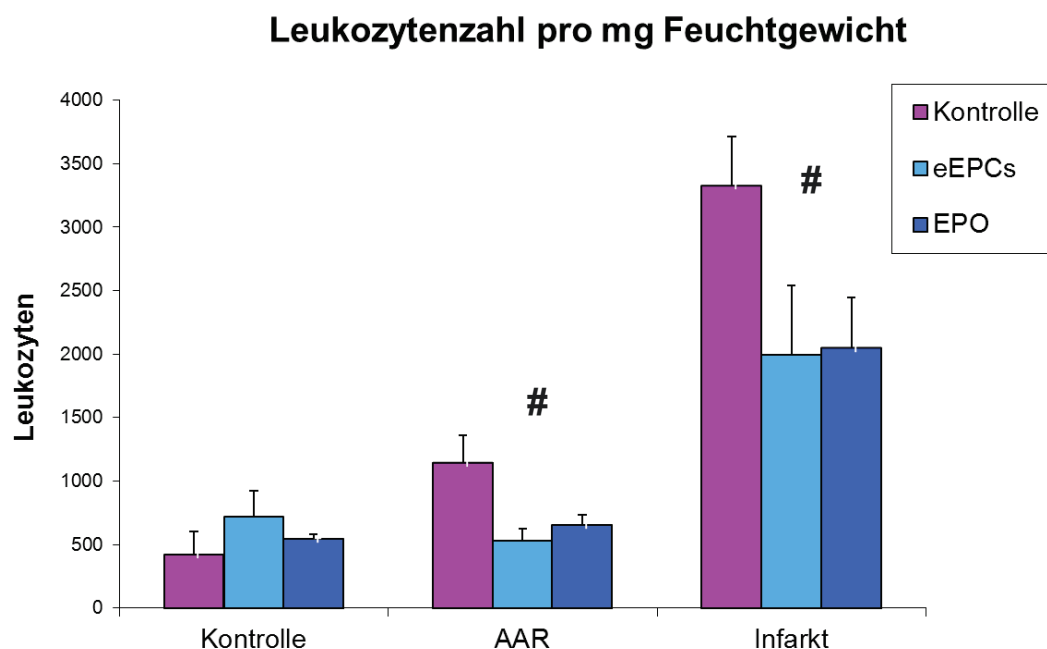
Um die Leukozyteninfiltration quantitativ anzugeben, wird im Großtiermodell die Leukozytenanzahl pro Milligramm Feuchtgewicht angegeben. Die Ergebnisse beziehen sich auf das Infarktareal, die AAR und eine von der Ischämie nicht betroffene Region.

### 3.2.1.4 Vergleichende Darstellung EPO und EPCs

In Abbildung 10 wird die Leukozytenzahl in den verschiedenen Bereichen dargestellt.

	Kontrolle	AAR	Infarkt
Kontrolle	420	1142	3323
eEPCs	716	527	1996
EPO	544	655	2047

Tabelle 3: Leukozyten pro mg Feuchtgewicht



Kontrolle (n=4); eEPCs (n=4); EPO (n=3); #: p<0,05 Kontrolle vs behandelte Tiere

**Abb. 10: Vergleichende Darstellung der Leukozytenzahl pro Milligramm Feuchtgewicht bei EPO und eEPC therapierten Tieren.**



In den Kontrolltieren lassen sich im gesunden Areal 420 ( $\pm$  180) Leukozyten pro Milligramm FG nachweisen. In der area at risk zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Leukozytenzahl auf 1142 Zellen ( $\pm$  220) (272 % der Kontrolle). 3323 Leukozyten ( $\pm$  388) sind in das Infarktareal eingewandert (791% der Kontrolle).

Bei den behandelten Tieren ist der Anstieg in der AAR und in der Infarktzone deutlich mitigiert. So sind bei den EPO behandelten Tieren bei einer Zellzahl im gesunden Myokard von 544 ( $\pm$  33) Leu/mg FG in der AAR 655 Leu/mg FG ( $\pm$  77) (121% der Kontrolle) und in der Infarktzone 2047 Leu/mg FG ( $\pm$ 398) (376% der Kontrolle) nachweisbar.

Bei den mit endothelialen Progenitorzellen therapierten Tieren zeigt sich im Kontrollareal ein Wert von 716 Zellen /mg FG( $\pm$  206). In der AAR lassen sich 526 Leukozyten ( $\pm$  97) nachweisen (73% der Kontrolle). Im Infarktgebiet sind 1996 Zellen ( $\pm$  546) nachweisbar (278% der Kontrolle).

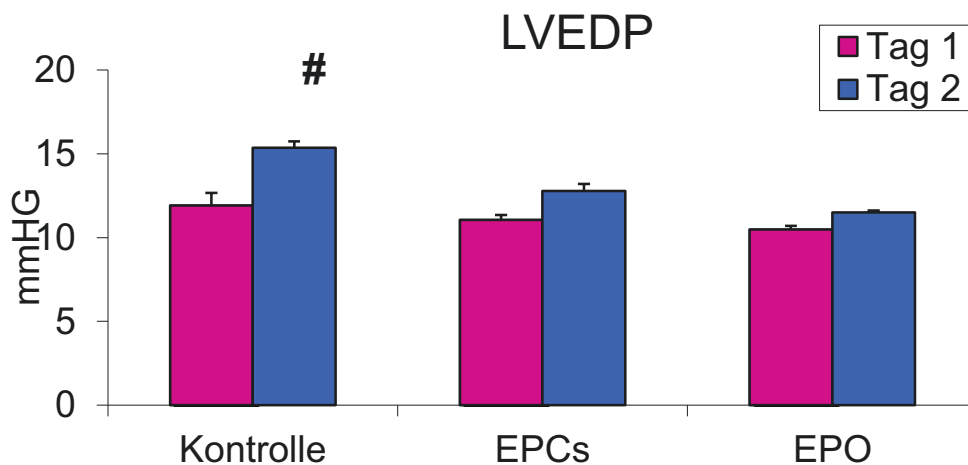
Im Kontrollareal läßt sich zwischen den Kontrolltieren und den behandelten kein signifikanter Unterschied nachweisen ( $p>0,05$ ). In der AAR sind in der eEPC- und in der EPO- Gruppe signifikant weniger Leukozyten als bei den unbehandelten eingewandert ( $\#p<0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied ergibt sich auch im Infarktareal zwischen den therapierten Tieren und der Kontrolle ( $p<0,05$ ). Die einzelnen Behandlungen unterscheiden sich weder in der Kontrolle noch in der AAR, noch im Infarktareal signifikant ( $p>0,05$ ) (vgl. Abb. 10 und Tabelle 3).

### 3.2.2 Funktionsmessungen

Um nicht nur die morphologischen Auswirkungen der Therapie zu evaluieren, werden vor und nach dem ischämischen Ereignis Funktionsdaten erhoben.

Hierfür wird der LVEDP als Maß für die Volumenbelastung erhoben. Die regionale Myokardfunktion wird mittels Sonomicrometrie quantifiziert.

#### 3.2.2.1 LVEDP



Kontrolle (n=4); EPCs (n=4); EPO (n=3); #:  $p < 0,05$  in der Kontrollgruppe Tag 1 vs Tag 2

**Abb. 11: LVEDP bei Kontroll- und bei den behandelten Tieren in mmHg**

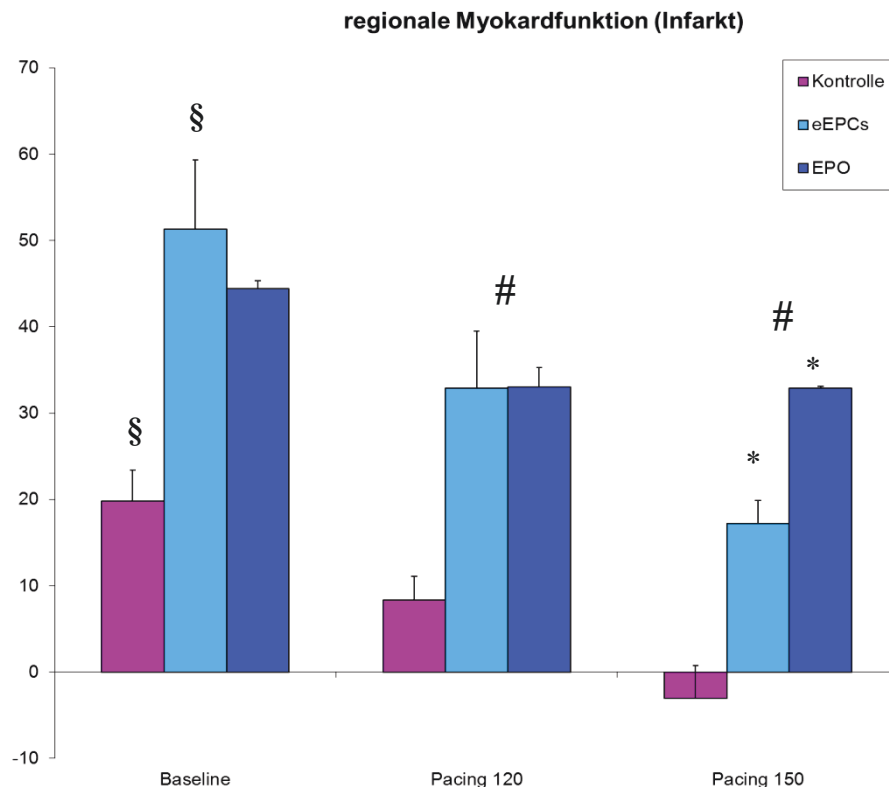
Der LVEDP im Kontrolltier zeigt nach dem Ereignis eine deutliche Zunahme. 11,9 mmHg stehen 15,4 mmHg nach dem Ereignis gegenüber. Dies entspricht einer Zunahme von 29%. Bei den mit eEPCs behandelten Tieren ist dieser Anstieg deutlich abgemildert. Es zeigt sich lediglich ein Anstieg von 11,1 mmHg auf 12,8 mmHg. Dies entspricht einer prozentualen Zunahme um 15,3 %.

In der EPO Gruppe ist lediglich ein Anstieg von 10,5 mmHg auf 11,5 mmHg zu beobachten. Dies stellt eine Zunahme um 9% dar (vgl. Abb. 11). Eine Signifikanz (#;  $p < 0,05$ ) lässt sich nur in der Kontrollgruppe feststellen. Bei den behandelten Tieren nimmt der LVEDP nicht signifikant zu.

### 3.2.2.2 Regionale Myokardfunktion (AAR)

Im Großtiermodell wird mittels Sonomicrometrikristallen die regionale Myokardfunktion überprüft. Sie wird prozentual zu einem nicht beeinträchtigten Areal im Bereich des Ramus circumflexus angegeben.

#### Infarktareal



Kontrolle (n=4); eEPCs (n=4); EPO (n=3); §:  $p < 0,05$  Kontrolle vs eEPCs; #:  $p < 0,05$  behandelt vs Kontrolle; \*:  $p < 0,05$  eEPCs vs EPO

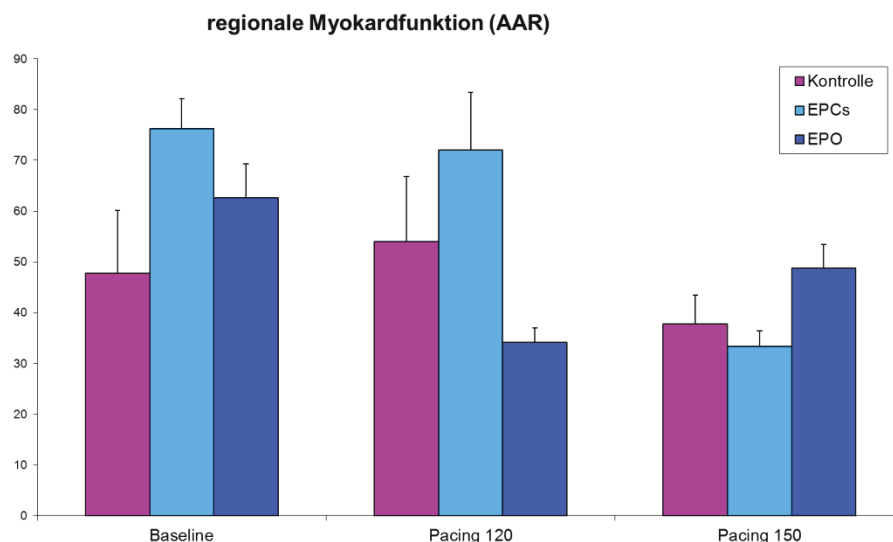
**Abb. 12: Regionale Myokardfunktion der Infarktzone ohne Schrittmacheraktion, mit einer Herzfrequenz von 120/min und bei 150/min.**

Bei der funktionellen Erhebung zeigt sich bei den unbehandelten Tieren in der Infarktzone eine subendokardiale Verkürzungsfraction von 20% im Vergleich zum gesunden Areal. Durch eine Therapie mit EPCs verbessert sich diese auf 51%. Die Funktion ist durch die Applikation ca. 2,5-mal besser als in der Kontrollgruppe (260%). Statistisch ist diese Verbesserung signifikant (§;  $p < 0,05$ ). Durch eine retrograde Applikation von EPO ergibt sich ein Wert von 45% und noch eine Verbesserung um das 2,3 fache (225%). Signifikant ist diese Verbesserung jedoch nicht ( $p > 0,05$ ).

Bei Belastung des Organs durch artifizielle Erhöhung der Frequenz mit einem Schrittmacher zeigt sich bei einer Herzfrequenz von 120 eine Shortening-fraction, die noch 8% der im Gesunden entspricht. Auch hier ist die Funktion im behandelten Tier deutlich verbessert. Sie beträgt für die Zelltherapie 36% (+429%) und für EPO 33% (+ 394%) der Kontrollregion im Bereich des Ramus circumflexus (RCX). Die behandelten Tiere weisen hier einen signifikanten Unterschied gegenüber den unbehandelten auf (#;  $p < 0,05$ ). Für die Art der Behandlung ergibt sich keine Signifikanz.

Bei einer weiteren Erhöhung der Belastung wird der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren noch deutlicher. So zeigt sich bei einer Frequenz von 150 pro Minute in der Zellgruppe ein Verbesserung um mehr als das siebzehn- bzw. zwölffache. Bei der EPC –Gruppe entspricht dies 47% RCX (+1719%) bei der EPO Gruppe 33% RCX (+1261%) (vgl. Abb. 12). Die behandelten Tiere schneiden hier signifikant besser ab als die unbehandelten (#; $p < 0,05$ ). Auch unterscheiden sich die Therapien signifikant (\*;  $p < 0,05$ ).

## AAR



Kontrolle (n=4); eEPCs (n=4); EPO (n=3); p für alle Gruppenvergleiche  $> 0,05$

**Abb. 13: Regionale Myokardfunktion der AAR ohne Schrittmacheraktion, mit einer Herzfrequenz von 120/min und bei 150/min**

Erwartungsgemäß zeigt sich in der AAR eine bessere regionale Funktion als im Infarktareal. So beträgt die Funktion ohne Erhöhung der Herzfrequenz 47% der Funktion im Referenzareal. Durch Behandlung mit eEPCs erreicht die Funktion einen Wert

von 76% RCX. Dies ist eine Steigerung um 59%. Auch durch die Therapie mit EPO kann eine Verbesserung beobachtet werden. 62% der kardialen Funktion im Referenzareal entsprechen einer Zunahme um 31%.

Erhöht man die Herzfrequenz, sind die in der AAR gemessenen Unterschiede nicht so ausgeprägt wie im Infarktareal.

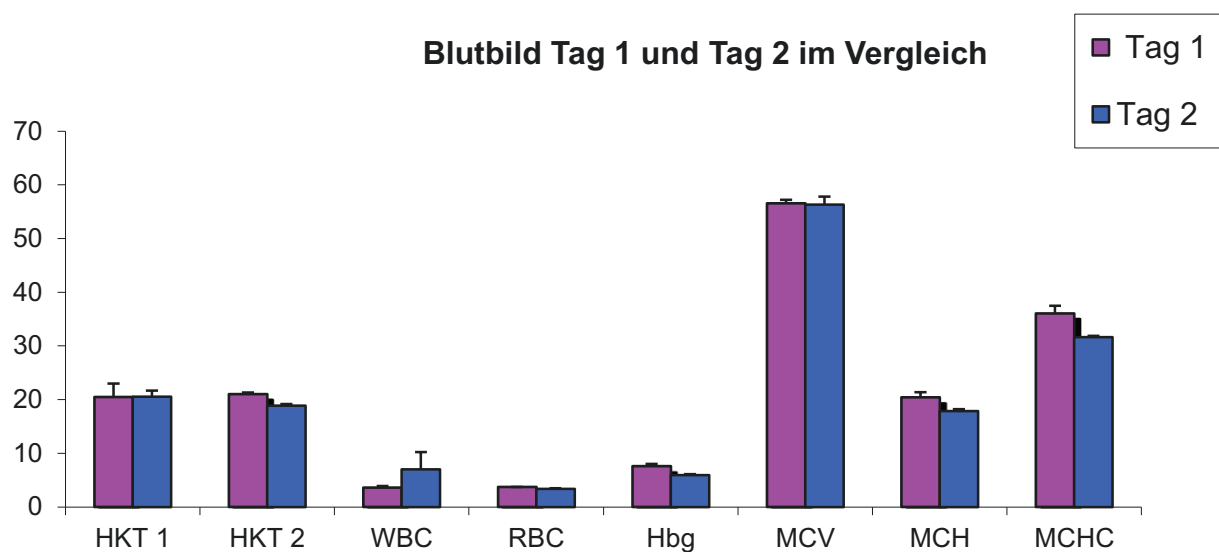
Ohne Therapie entspricht die Funktion noch 54% der Kontrollregion im Versorgungsgebiet des Ramus circumflexus. EPCs verbessern auch hier die Funktion. Ein gemessener Wert von 65% RCX bedeutet eine Zunahme von 21% bei einer Herzfrequenz von 120. Bei einer Frequenz von 150 pro Minute verbessert sich die Funktion von 38% RCX auf 72% RCX unter der Zugabe von Zellen. Dies sind 90% im Vergleich zu den Untherapierten.

Bei der Hormontherapie zeigt sich eine Verschlechterung der Funktion. 34% stehen 54% des Kontrollareals ohne Therapie gegenüber. Es kommt in dieser Gruppe zu einer Abnahme gegenüber der Kontrolle um 37%.

Bei 150 Schlägen pro Minute hingegen zeigt sich eine erneut erwartete Verbesserung. Hier verbessert EPO die Funktion, jedoch nicht in gleichem Ausmaß wie die Zelltherapie. 48% RCX entsprechen nur einer Zunahme um 29% im Vergleich zur Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied konnte hier nicht nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ) (vgl. Abb. 13).

### **3.2.3 Blutbild**

Sowohl am Behandlungstag als auch 24 Stunden nach der Intervention wird ein kleines Blutbild abgenommen. Ziel dieser Untersuchung ist es, eine mögliche Wirkung durch einen erhöhten Hämatokrit auszuschließen. Die Vergleichbarkeit der Tiere wird durch einen standardisierten Versuchsaufbau gewährleistet. Bei den Interventionen kam es zu keinem nennenswerten Blutverlust.



(n=3); p für alle Gruppen >0,05

**Abb. 14: Vergleichende Darstellung des Blutbildes an vor und nach Ereignis bzw. Therapie**

Nach dem Ereignis zeigen sich nur geringe Schwankungen im Bereich des Hämatokrits (HKT), der jeweils doppelt bestimmt ist. Eine Erhöhung lässt sich jedoch nicht feststellen. (20,5(±2,5) bzw. 21,05(±0,25) vs. 20,53(±1,175) bzw. 18,9(±0,3)) Die Leukozytenzahl steigt um 3,6(±0,3) auf 7(±3,2). Die Erythrozyten sinken von 3,72(±0) auf 3,35(±0,145). Das Hämoglobin sinkt von 7,6(±0,4) auf 5,95(±0,15).

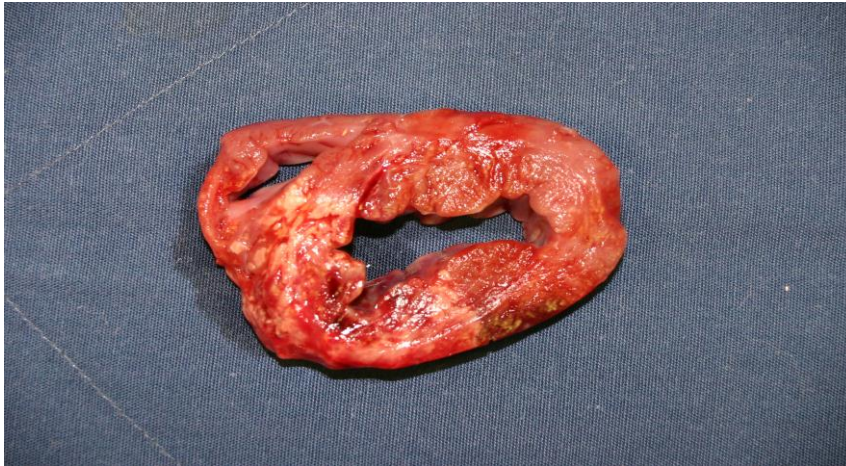
Die Eigenschaften der Erythrozyten bleiben nahezu konstant. Das mittlere korpuskuläre Volumen zeigt am Tag eins einen Wert von 56,55(±0,65) an, am Tag zwei einen Wert von 56,35(±1,45). Das mittlere korpuskuläre Volumen fällt von 20,4(±1) auf 17,85(±0,35). Dementsprechend fällt auch das MCHC von 36,05(±1,45) auf 31,65(±0,25). (vgl. Abb. 14)

### 3.2.4 Analyse der Infarktgröße

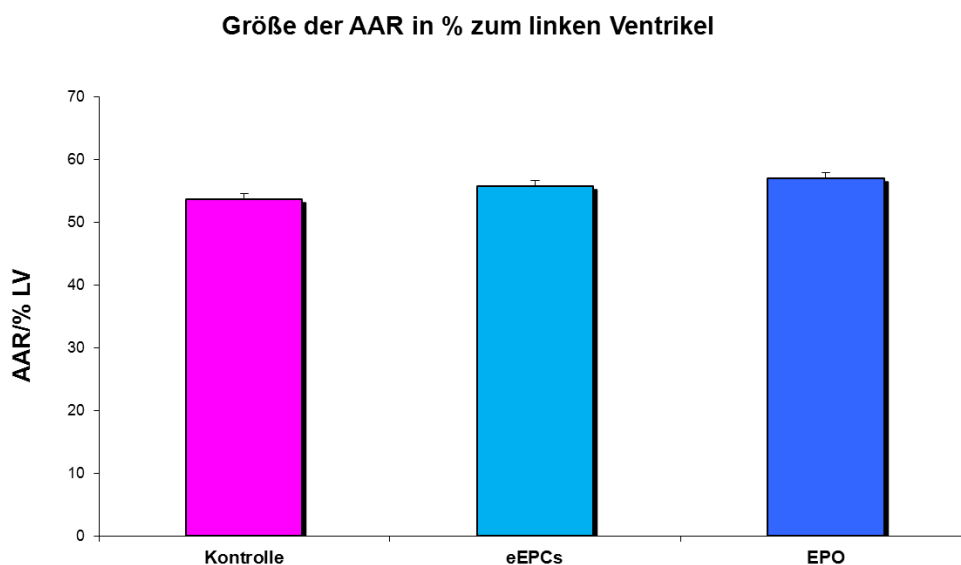
#### AAR

Nach Euthanasie der Schweine wird das Herz nach TTC-Färbung in fünf transversale Schnitte zerteilt. Die Schnitte werden unter makroskopischen Gesichtspunkten in

Kontrollregion, AAR und Infarktregion unterteilt. Diese werden fotografiert und dann volumetrisch ausgewertet. Die unbehandelte Kontrolle wird aus sechs Tieren gemittelt (vgl. Abb. 15).



**Abb. 15: Schnitt eines mit EPO behandelten Herzens**



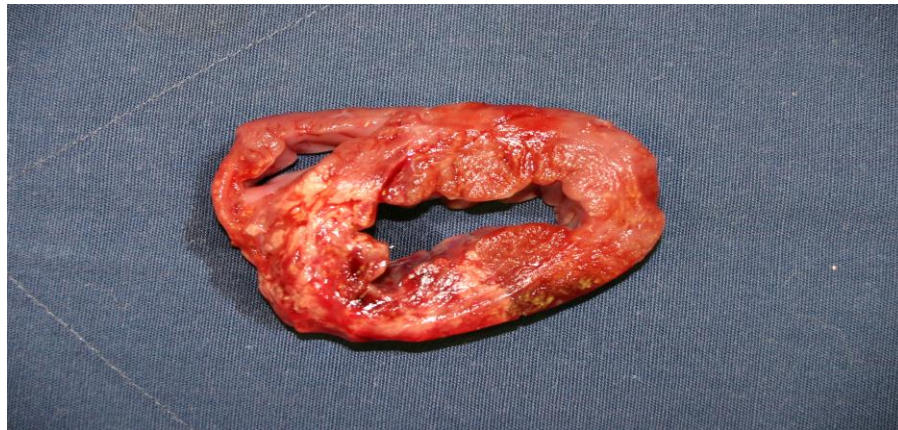
Kontrolle (n=6); eEPCs (n=7); EPO (n=3); p zwischen allen Gruppen > 0,05

**Abb. 16: Größe der AAR in % des linken Ventrikels**

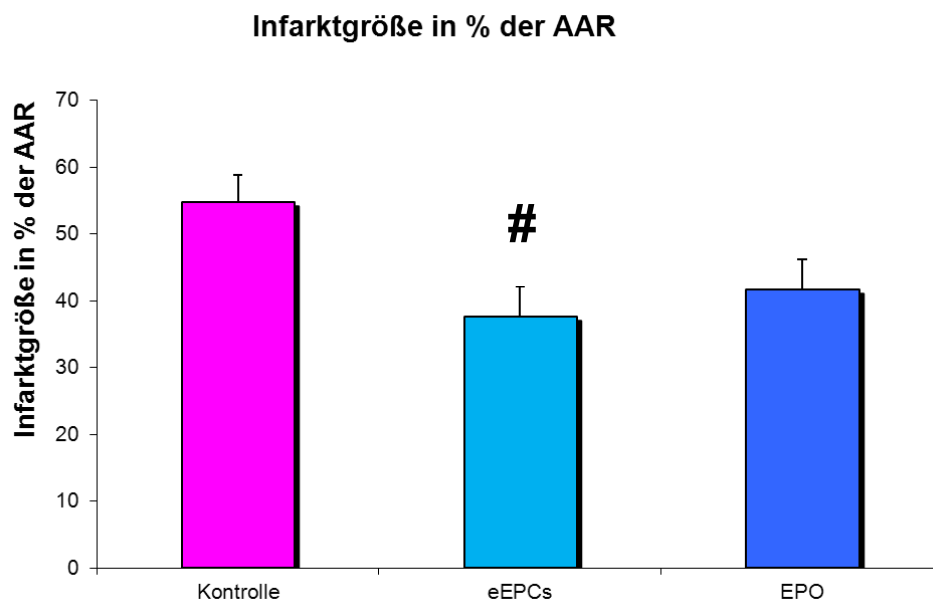
Die AAR wird in Prozent zum gesamten linken Ventrikel dargestellt. Es zeigt sich bei der Kontrolle eine im Mittel 51% ( $\pm 2,065$ ) der Fläche des linken Ventrikels einnehmende AAR. Durch die Therapie vergrößert sich die AAR. Bei den mit EPCs therapierten Tieren nimmt sie 57% ein ( $\pm 2,46$ ). In der EPO-Gruppe beträgt sie 62% ( $\pm 3,21$ ). Insgesamt unterscheidet sich die AAR zwischen behandelten und

unbehandelten Tieren jedoch kaum (Vgl. Abb. 16). Es ergeben sich hier keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

## Infarkt



**Abb.17: Schnitt eines mit EPO behandelten Herzens**



Kontrolle (n=6); eEPCs (n=7); EPO (n=3); #:  $p < 0,05$  (Kontrolle vs eEPCs)

**Abb.18: Infarktgröße in Prozent der AAR**

Die Infarktgröße wird im Verhältnis zur AAR angegeben (vgl. Abb. 17). Der Infarkt beträgt ohne Therapie eine Größe von 55% der AAR ( $\pm 4,11$ ). Durch eine Therapie mit eEPCs verkleinert sich das Infarktareal auf 38 der AAR. ( $\pm 4,49$ ). Diese



Veränderung ist statistisch signifikant (#;  $p < 0,05$ ). In der EPO Gruppe beträgt das Infarktareal noch 42% der AAR( $\pm 4,62$ ) ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (vgl. Abb.18).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Auswahl der Versuchstiere**

Für die Qualität der Ergebnisse spielt die Auswahl der Versuchstiere eine große Rolle. Um auf den Menschen übertragbare Ergebnisse zu produzieren, sollten sowohl eine physiologische, eine pathophysiologische als auch eine anatomische Ähnlichkeit bestehen. Einfluss auf die Auswahl der Spezies nehmen ebenso ethische, ökologische und praktische Erwägungen.

Nager als Versuchstiere sind aufgrund ihrer ähnlichen Hypoxieulnerabilität, einer ähnlichen pathophysiologischen Reaktion und nicht zuletzt aufgrund ihrer geringen Kosten sehr beliebt. Nager sind der Hauptlieferant von Zelllinien. Für Versuche an isolierten Organen sind sie aufgrund der geringen Organgröße gut geeignet. Die Spezies Maus ist immunologisch gut charakterisiert. Versuche am isolierten Mäuseherz sind in der Literatur ausführlich beschrieben und somit gut vergleichbar.

Schweine weisen eine große physiologische und anatomische Ähnlichkeit zum Menschen auf. Die Anatomie der Koronargefäße ist nahezu mit der humanen identisch (99,100). Des Weiteren liegt bei dieser Spezies eine Kollateralisierung des Herzens vor, die etwa der humanen entspricht (101). Die pathophysiologische Reaktion auf ein ischämisches Ereignis ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eher übertragbar als zum Beispiel beim Hund. Das Ausmaß der Umgehungskreisläufe limitiert zum einen das Überleben, zum anderen beeinflusst es maßgeblich die Funktionsfähigkeit des betroffenen Myokards (102,103). Im Vergleich zum Hund weist das Schwein - wie auch der Mensch - eine deutlich geringere Kollateralisierung auf. Nach Verschluss einer Koronararterie verbleibt im Schwein ein Blutfluß von 1,5%. Beim Hund sind es bis zu 37% (104-107). Es ist nicht verwunderlich, dass das porcine Herz eine dementsprechend verminderte Ischämietoleranz aufweist. 45-90 Minuten stehen 3-6 Stunden gegenüber (102,108,109). Des Weiteren ist der Blutfluss über die Umgehungarterien beim Hund nicht homogen. Vor allem der Randbereich des ischämischen Areals sowie subepikardiale Wandschichten werden besser perfundiert (107). Es zeigen sich bei Verschluss einer Koronararterie unterschiedliche histologische Korrelate bei Hund und Schwein. Im porcinen Modell zeigt sich nach entsprechender Ischämie ein transmuraler Infarkt. Aufgrund der höheren anatomischen Konstanz ist dieser auch eher reproduzierbar als beim Hund. Dieser weist wegen seines

inhomogenen Vaskularisierungsmusters eher ein unregelmäßig begrenztes, meist nur subendokardiales Infarktareal mit einigen Inseln intakten Myokards auf (107,110). Abgesehen von den anatomischen Unterschieden bzw. bedingt durch diese, sind auch Unterschiede in der Ausprägung pathophysiologischer Reaktionen zu beobachten. So ist das myocardial stunning und der Effekt des preconditionings beim Schwein deutlich stärker ausgeprägt (110).

Ein Unterschied zwischen Mensch und Schwein ist die fehlende Ausbildung der Arteriosklerose. Bei der Untersuchung eines akuten Effektes spielt dies jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

## **4.2 Auswahl der Methoden**

### **4.2.1 In vitro Versuche**

Neonatale Rattenmyozyten sind bei Versuchen mit kardiologischer Fragestellung etablierte Zellpopulationen. Die Hypoxiekammer ist als Model für Hypoxie–Reoxygenierung mehrfach beschrieben. In diesem Versuchsaufbau können unter kontrollierten, reproduzierbaren Bedingungen Zellen einer unterschiedlich langen Hypoxie ausgesetzt werden (111). Diese Methode schließt systemische Störgrößen weitgehend aus. Somit werden also nur direkte Effekte einer Substanz bzw. eines Hormons wie EPO messbar. Die Inkubation mit verschiedenen Agentien ist ohne weiteres möglich und gut variierbar. Die Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten stellt ebenfalls kein Problem dar. Die Auswertung der durchgeführten Versuche ist etabliert, einfach und sicher. So penetriert Trypanblau zuverlässig die toten Zellen. Lebende Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf. Aufgrund der geringen Störanfälligkeit sowohl in Durchführung als auch in der Auswertung ist die Entscheidung für dieses Modell gefallen.

Um die verschiedenen Therapien zu untersuchen, wählten wir ein Model am isolierten, murinen, schlagenden Herzen. Im Langendorff-Modell kann unter annähernd physiologischen Bedingungen die Wirkung von verschiedenen Stoffen untersucht werden (112). Neben den Substanzen wird auch die Ischämie bzw. die Reper-fusionszeit variiert. Die Perfusion mit oxygenierter, zellfreier Lösung ist nicht

als physiologisch zu betrachten, ist aber als Modell anerkannt (113). Auch die Isolation des Organs ist gerade bei einer Substanz wie EPO nicht unkritisch zu bewerten. Durch sie werden humorale Effekte weitgehend ausgeklammert. Epo hat jedoch verschiedene Wirkungsweisen, die durch zirkulierende Mediatoren vermittelt werden. Die Erfolgsorgane liegen zum Teil auch außerhalb des betroffenen Areal. Zum Beispiel moduliert Epo die inflammatorische Antwort nach Ischämie/Reperfusion (114,115). Diese Wirkung bezieht sich zum einen auf das betroffene Gewebe, in welchem weniger Zytokine exprimiert werden und das durch geringeren Zelluntergang auch weniger Antigene präsentiert. Zum anderen bezieht sich dies auch auf die Leukozyten, die zumindest in einem experimentellen Setting weniger Zytokine produzieren (116). In konkretem Fall sind auch keine zirkulierenden endothelialen Stammzellen in der Lösung, so dass diese als Aktionspartner ausfallen (117). Durch diese Voraussetzungen wird also der direkte Effekt von EPO auf das schlagende Herz isoliert. Durch die zellfreie Lösung und die exakt einstellbaren Umgebungsbedingungen sind die Versuche unter identischen Abläufen wiederholbar.

#### **4.2.2 Regionale Kardioprotektion durch Erythropoietin**

Die selektive druckregulierte Retroinfusion ist ein im Tiermodell etabliertes und am Patienten angewandtes Verfahren, um selektiv in betroffene Herzareale Agentien zu applizieren (118-120). Alternativ wäre neben der unselektiven intravenösen Applikation noch das direkte intramyokardiale Verfahren zu nennen. Dabei wird durch einen speziellen Katheter das Agens direkt in den Herzmuskel injiziert (121). Eine weitere Möglichkeit ist, Behandlungen nach Thorakotomie direkt am offenen Herzen durchzuführen.

Wir haben die selektive druckregulierte Retroinfusion angewandt. Das Trauma ist bei dieser Methode gering, da es sich um ein interventionelles und kein operatives Verfahren handelt. Durch die lokale Applikation kann mit geringen Dosen eine hohe Konzentration des Wirkstoffs im betroffenen Areal erreicht werden. Da der Katheter unter Bildwandlerkontrolle in Seldinger-Technik eingebracht wird, kann das Areal vor der Injektion genau identifiziert werden. Durch die geringere Dosis bleiben systemische Wirkungen weitgehend aus. Des Weiteren ist nach 24 Stunden nicht mit einem messbaren hämatopoetischen Effekt zu rechnen. Eine maßgebliche

Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark ist so nach dieser Zeit ebenfalls nicht anzunehmen. Wir bestätigten dies durch ein nahezu unverändertes Blutbild. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die einmalige Retroinfusion von Erythropoietin zumindest zu keinem Anstieg der Erythrozyten bzw. Hämatokrits führt.

## **4.3 Eigene Ergebnisse**

### **4.3.1 Einfluss von Erythropoietin auf den Zelltod nach Hypoxie und Reoxygenierung**

Wie beschrieben, unterzogen wir neonatale Rattenmyozyten einer Hypoxie und reoxygenierten die Zellen danach wieder. Neben EPO, das vor bzw. nach der Ischämie verabreicht wurde, gaben wir auch eEPCs zu. Unsere Resultate zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen eEPC oder Erythropoietin behandelten und unbehandelten Zellen. Zwischen den beiden Therapien konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Eine Koapplikation erbrachte keinen additiven Benefit.

EPO-R wird auf verschiedenen kardiovaskulären Zellen gefunden. Der Rezeptor wird von vaskulären Endothelzellen, von neonatalen wie von adulten Kardiomyozyten, vor allem aber von kardialen Bindegewebe exprimiert (56,62,122). Die Produktion des Proteins im Herzen selbst kann jedoch weder unter normoxämischen/ normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (123). Diese Erkenntnisse aus transgenen Mäusen deuten darauf hin, dass EPO für die kardiale Entwicklung und Funktion von essentieller Bedeutung ist.

EPO am adulten Herzen wirkt pleiotroph, immunmodulatorisch, angiogen und anti-apoptotisch. Dies zeigt sich sowohl bei der kurzfristigen Behandlung akuter Ereignisse als auch bei der langfristigen Applikation nach Ischämie und Reperfusion (124).

In der Literatur wird für EPO ein positiver Effekt durch die Gabe vor Ischämie/ Reperfusion (Preconditioning)(123) konstatiert. Auch für die Behandlung während oder nach einem solchen Ereignis wird ein Benefit beschrieben (57,125,126). EPO hat nach unseren Ergebnissen einen signifikanten Effekt auf das myozytäre Überleben. Dass hierbei die PI3Kinase eine zentrale Rolle für den antiapoptotischen Effekt in den Myozyten spielt, haben Trammatano et al. mittels gezielter Inhibition dieses

Enzyms nachgewiesen (68). Gleiche Ergebnisse erzielen Cai et al.(57,123): Bei der Koapplikation von EPO und dem PI3K-Inhibitor Wortmannin kann kein akuter kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden (57). Ein alternativer Weg via der mitogen/extracellular signal-regulated kinase (MEK) wird von Hanlon et al. ausgeschlossen. So zeigt sich kein abschwächender Effekt auf die Kardioprotektion durch spezifische Hemmung dieses Enzyms.

Die Hemmung der von der Proteinkinase C initiierten Kaskade hatte bei anderen Versuchsaufbauten einen deutlicheren Effekt. Dies äußert sich nicht nur in einer kleineren Infarktgröße, sondern auch in der kardialen Funktion (LVEDP) nach der experimentell induzierten Ischämie (127). Insgesamt wird die oben erwähnte zytoprotektive Kaskade als so genannte Reperfusion injury salvage Kaskade (RISK) in der Literatur eingeführt. Diese umfasst zum einen den PI3K-AKT pathway zum anderen den bereits erwähnten ERK 1/2 pathway. Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Cardiotrophin-1 (CT-1), Urocortin und Bradykinin wirken ebenfalls über diesen Weg (47). Auch EPO vermittelt seine kardioprotektive Aspekte über den RISK pathway (48).

Humorale Effekte bzw. die Mobilisierung von Knochenmarksvorläuferzellen spielen in diesem Versuchsaufbau keine Rolle (117,128). So ist davon auszugehen, dass die direkte Wirkung von EPO auf die Zelle zu diesem Effekt führt. Myozyten weisen beide Arten von EPO Rezeptoren auf. Beide vermitteln einen zytoprotektiven Effekt über den schon mehrfach erwähnten RISK pathway.

In myokardialem Gewebe regt das Hormon das Wachstum von Kapillaren vergleichbar mit VEGF an (129). Auch im experimentellen Rattenmodell konnten van de Meer und Lipsic eine verbesserte Angiogenese nachweisen (130). Sie stellen eine vermehrte Kapillarisierung und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion fest, nachdem sie Ratten nach einem akuten ischämischen kardialen Ereignis drei Wochen mit EPO behandelten.

eEPCs haben ebenfalls ein kardioprotektives Potential und werden des Weiteren als möglicher Wirkungsort für EPO beschrieben. EPO beeinflusst das Überleben von endothelialen Progenitorzellen PI3K abhängig (117). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl als auch die funktionelle Aktivität von EPCs durch EPO gesteigert werden kann. Diese Wirkung ist dosisabhängig. EPO ist ein physiologischer Stimulus für die Mobilisierung von endothelialen Stammzellen aus dem Knochenmark (131,132).

#### **4.3.2 Einfluss von Erythropoietin auf die AKT-Expression und -Phosphorylierung**

Im Langendorffversuch untersuchten wir die Reaktion des schlagenden Herzens nach Zugabe von verschiedenen Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten. EPO bewirkt im Vergleich zu den anderen im Versuch verabreichten Substanzen die ausgeprägteste Aktivierung der AKT. Wie oben beschrieben, ist die Aktivierung dieses Signalweges mit Hemmung der Apoptose und somit mit einem vermehrten Zellüberleben vergesellschaftet. Der prozentuale Anteil bei alleiniger Gabe von EPO übersteigt den der Kontrolle um etwas mehr als das Doppelte. Dies ist auf einen direkten Effekt von EPO zurückzuführen, da durch die Isolation des Organs andere Einflussgrößen ausgeschaltet sind. Das Vorhandensein von Rezeptoren im Myokard kann wie erwähnt diese direkte Zytoprotektion erklären. Die Wirkung ist PI3-Kinase vermittelt (71). Ein additiver Effekt durch die Zugabe von endothelialen Progenitor Zellen ist nicht zu sehen (+12%). Im Gegenteil ist der Effekt deutlich schwächer unter Zugabe dieser Zellen. In der Zellkultur konnte tendenziell Ähnliches beobachtet werden. Hier ist die Abschwächung jedoch deutlich geringer ausgebildet. Ursachen können hierfür nur hypothetisch genannt werden. Wie beschrieben besitzen auch EPCs einen EPO Rezeptor (62). Ein Teil des Substrates mag an diesen Rezeptor binden und geht somit den betroffenen Zellen verloren (117). Da beide Therapieprinzipien ihre Wirkung über den selben Signalweg entfalten (57,133), könnte es hier zu einer kompetitiven Hemmung gekommen sein. Interessanterweise beschreibt jedoch Purnier et al., dass EPO nur bei einer so hohen Dosis seine kardioprotektive Wirkung entfaltet, in welcher auch Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden (134). Dieses Ergebnis bezieht sich jedoch auf das Remodeling nach einem hypoxischem Ereignis. Des Weiteren wird in dieser Studie die Therapie erst nach sieben Tagen begonnen. Auch an anderer Stelle wird ein Fehlen eines Effektes beschrieben (135). Diese Artikel unterscheiden sich jedoch von der Methodik deutlich von unserer. Der akute kardioprotektive Effekt von EPO und von endothelialen Progenitorzellen kann insgesamt im experimentellen Setting als gesichert angesehen werden.

Ein weiterer starker Trigger für die Aktivierung der AKT scheint die Reperfusion zu

sein. So steigt die Fraktion der aktivierten AKT nach einer Stunde um 104 %, also um mehr als das Doppelte. Behandelte Organe weisen nach einer Stunde eine geringere Aktivierung gegenüber der Kontrolle auf. Bei einer Behandlung mit EPO sinkt der Anteil sogar unter den der Kontrolle.

Ursächlich dafür könnte sein, dass durch die initiale Mehraktivierung ein Teil der AKT bereits verbraucht ist und somit die maximale Aktivierung früher zu erwarten ist. Der starke Anstieg in unseren Versuchen nach 15 min wäre ein Indiz hierfür. EPO würde also den positiven Effekt der Reperfusion nicht mitigieren, sondern nur etwas am Zeitpunkt des Eintretens ändern. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass durch die Applikation mehr Myozyten überleben. Ein geringerer Schaden im Gewebe würde somit auch einen geringeren Trigger für die Aktivierung des AKT Pfades darstellen. Housenloy et al. beschreiben eine Mehraktivierung der AKT durch eine kurze Ischämie-/ Reperfusionsphase vor dem eigentlichen Versuch. In Ihrer Arbeit an Rattenherzen zeigt sich eine verbesserte Ischämietoleranz und eine deutliche Erhöhung der aktivierten AKT(136). Wird nun der Effekt der Präkonditionierung durch eine zellprotektive Therapie vermindert, kann angenommen werden, dass auch die Aktivierung der AKT vermindert ist.

Im Schweinemodell ist zu beobachten, dass die Konzentration der aktivierten AKT im Infarktareal am höchsten ist. Ischämie ist - wie erwähnt - ein starker Trigger für die Aktivierung dieser Kaskade. Dieser Trigger ist sicherlich im Infarktareal am größten.

In der AAR zeigt die deutlichere Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle eine massive Aktivierung des  $IP_3$  Survivalpathways durch das Hormon und den Trigger Ischämie. Dies wird in der aktuellen Literatur ähnlich diskutiert (57,137).

So werden sich kontrahierende Mausmyozyten für dreißig Minuten einer Hypoxie ausgesetzt. Es ist nachgewiesen, dass, anders als die unbehandelten Zellverbände, die EPO konditionierten nicht in einen proinflammatorischen Phänotyp konvertieren. Die Translokation von AP 1 wird gesteigert. Der eNOS Spiegel, die Proteinexpression und die NO-Produktion sind erhöht. Wird ein Inhibitor der PI3-Kinase hinzugegeben, können die Effekte nicht mehr beobachtet werden. Es steigen die Myeloperoxidasewerte, als Hinweis auf eine Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten (138). Bei den in vivo Versuchen kann der EPO Effekt durch Knockout eines der Proteine des Dimeres AP-1 (c-fos) egalisiert werden. Die durch EPO induzierte Immun-



modulation benötigt Stunden, um bestätigt werden zu können (139). Der antiapoptotische Effekt hingegen kann bereits nach Minuten nachgewiesen werden (115).

#### **4.3.3 Einfluss von Erythropoietin auf die Leukozyteninvasion in das Ischämiegebiet**

Unsere Versuche zeigen, dass im geschädigten Myokard durch die Therapie mit EPO bzw. eEPCs weniger Leukozyten nachweisbar sind.

Zwei mögliche Ursachen können diesem Effekt zugrunde liegen. Zum einen mag die reduzierte Zahl an untergegangenen Zellen eine Rolle spielen, zum anderen ist eine immunmodulatorische Komponente dafür verantwortlich. Dies ist in der Literatur sowohl für ein akutes hypoxisches Ereignis als auch für die chronische Herzinsuffizienz beschrieben (114,140). Li weist nach, dass bei chronischer Applikation für sechs Wochen die IL 6, IL-1 $\beta$ , TNF alpha und TGF 1 $\beta$  Spiegel annähernd normal, protektive Faktoren wie STAT 5 und die AKT jedoch erhöht sind (114).

Bei akutem oxidativem Stress exprimieren Myozyten, platelet activating factor (PAF) vermittelt, E-Selectine und Adhäsionsmoleküle. Diese induzieren eine transendotheliale Migration von polymorphkernigen Leukozyten. Das Ausmaß der Leukozytenmigration ist dabei vom Grad des oxidativen Stresses abhängig (140).

EPO induziert wie oben erwähnt AP1 -bzw. PI3, vermittelt die endotheliale NO-Synthetase und steigert somit die Menge an verfügbarem NO. NO reduziert Sauerstoffradikale zu Peroxynitrit, welches dann aus der Zelle ausgeschleust wird. Hierdurch wird der oxidative Stress vermindert.

#### **4.3.4 Einfluss von Erythropoietin auf die Infarktgröße**

Wir haben nachgewiesen, dass EPO die Infarktgröße bezogen auf die AAR verringert. Die AAR ist erwartungsgemäß in den behandelten und unbehandelten Tieren annähernd gleich groß. Prognostisch ausschlaggebend ist jedoch die Infarktgröße. Die AAR weist noch eine annähernd normale Elektrophysiologie auf, ist jedoch funktionell beeinträchtigt. Daraus resultiert eine Reaktion, die zum Teil auch für das Über-

leben der Zellen pathophysiologisch sinnvoll erscheint. So ist in diesem Randgebiet der pH-Wert niedriger und somit wird durch eine Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve der Sauerstoff aus dem Blut leichter abgegeben. Der pleiotrophe Effekt von EPO ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Dies gilt sowohl unter neurologischen als auch kardialen Gesichtspunkten. Die Applikation von EPO führt in verschiedenen Dosen zu positiven Effekten sowohl in der akuten als auch in der chronischen Anwendung (141-143). Umstritten sind jedoch insbesondere die Frage der Dosis, der Applikationsart und des Anwendungszeitpunkts. Auch gibt es Studien, die keinen Effekt sehen (135). Einige Autoren vermuten einen engen Zusammenhang zwischen dem Potential der Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark und der Wirkung der Substanz (132,134). Auch in unseren Versuchen zeigt sich die Behandlung mit eEPCs tendentiell potenter. Unsere eigenen Daten ergeben jedoch in vitro einen deutlichen Effekt für EPO. In diesen Versuchsaufbauten werden - wie beschrieben - Mechanismen zirkulierender Zellen ausgeklammert. Die gesehenen Effekte sind somit am ehesten auf eine direkte EPO-Wirkung zurückzuführen. Dies lässt sich auch mit der aktuellen Literatur vereinbaren. Es sind zwei EPO Rezeptoren an der Myokardzelle beschrieben. Der EPO-R und der beta-common-Rezeptor (71,124,144). Die durch diese beiden Rezeptoren aktivierbare Kaskade hat antiapoptotische Eigenschaften und wirkt somit zytoprotektiv. Dies geschieht auch ohne die zusätzliche Präsenz von mobilisierten Stammzellen, die von einigen Autoren gefordert wird (134).

Auch sind bei der chronischen Anwendung von sehr niedrig dosiertem EPO positive Effekte zu verzeichnen. So beschreiben Lipsic et al, dass sie bei der chronischen Anwendung Effekte auf das Herz, jedoch keine Erhöhung des Hbs bzw. des Hämatokrits sehen (145). Es sind hier die endothelialen Stammzellen nicht erwähnt. Diese Beobachtung legt jedoch nahe, dass zumindest nur in geringer Zahl Stammzellen mobilisiert werden.

Am isolierten Herzen sehen wir keinen additiven zytoprotektiven Effekt durch die Koadministration von EPO und eEPCs. Auch in der Zellkultur ist kein zusätzlicher Effekt zu sehen.

Es gibt jedoch Studien, die diese oben beschriebenen Daten nicht nachvollziehen konnten. So wird in einer Arbeit mit einem porcinen Modell von Kirstensen kein akuter Effekt gesehen (146). Ebenso besteht Uneinigkeit über die Dosis. So hat die

Gruppe um Lipsic (145) bei niedriger Dosis, die den Haematokrit nicht berührt, einen Benefit erkannt. Purnier et al haben diesen nur bei einer so hohen Dosis erkannt, in der auch Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden (134).

#### **4.3.5 Einfluss von Erythropoietin auf die Myokardfunktion**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch die akute Anwendung von EPO die regionale Funktion in den betroffenen Gebieten verbessert werden kann. Dies deckt sich mit bereits vorhandenen Ergebnissen, die jedoch eine andere Applikationsart wählten (122,147).

Besonders deutlich wird dies, wenn das Organ nach dem Ereignis oxidativem Stress durch Erhöhung der Herzfrequenz ausgesetzt wird. Hierbei zeigt sich eine erhöhte kardiale Reserve bei den behandelten Tieren.

Im Infarktareal kann eine deutlich verbesserte Kontraktilität gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies lässt auf einen erhöhten Anteil noch funktionierender Myozyten schließen.

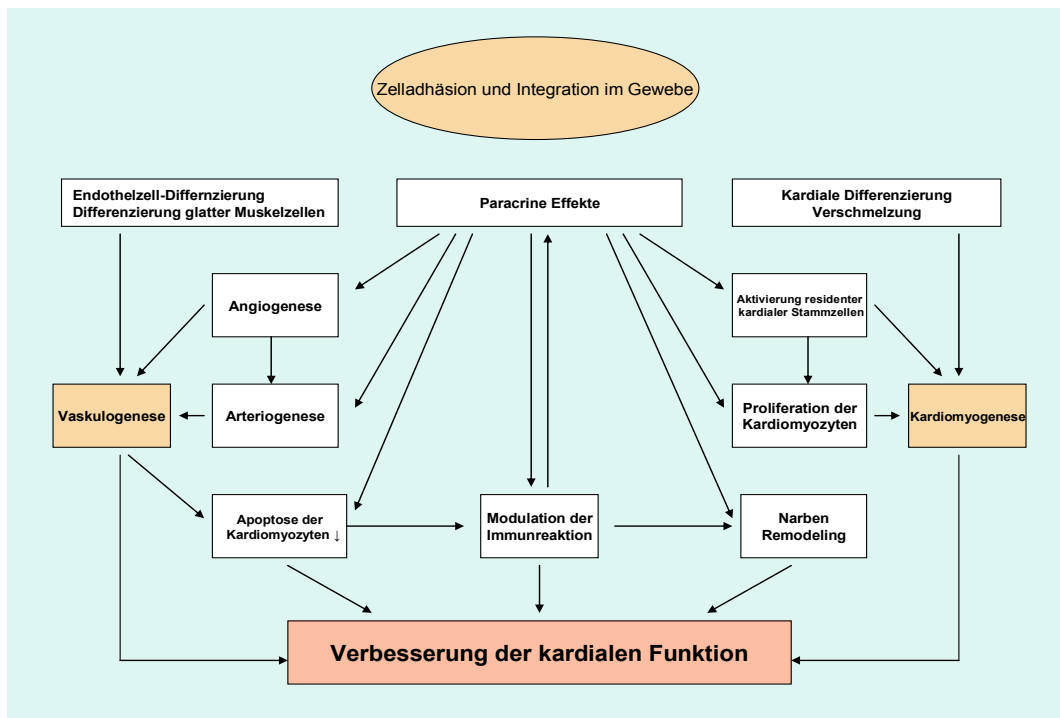
Die Verringerung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes ist ein Marker für die geringere Volumenbelastung. Dies ist durch die global verbesserte Herzfunktion erklärbar.

#### **4.4 Kardioprotektives Potential von Erythropoietin im Vergleich zu EPCs**

Um die Ergebnisse einordnen zu können, werden sie mit der Therapie mit endothelialen Progenitorzellen verglichen. Diese Therapie hat nachweisbar das Potential einen Ischämie- Reperfusionsschaden abzumildern (133).

Mehrere Studien zeigen, dass die intrakoronare Infusion von autologen Knochenmarksstammzellen sicher bei Patienten mit Herzinfarkt durchführbar ist. In den ersten

veröffentlichen Studien zeigt sich nahezu übereinstimmend, dass sich die links-ventrikuläre Funktion verbessert, die endsystolischen Volumina verringern und dass die Perfusion im infarzierten Areal deutlich steigt (148-150) (vgl. Abb. 19).



**Abb. 19: Wirkung von Stammzellen bei kardiovaskulären Reparaturvorgängen, aus Dimmeler et al 2008 (86)**

Ebenso zeigt sich die Zelltherapie gegenüber dem Placebo im Bezug auf klinische Endpunkte überlegen. So kann in der REPAIR AMI-Studie neben einer verbesserten kardialen Physiologie auch nachgewiesen werden, dass Endpunkte wie Tod, Reinfarkt und erneute Hospitalisierung wegen dekompensierter Herzinsuffizienz bei den mit gereinigten Knochenmarkszellen Transfundierte signifikant geringer sind als bei der Kontrollgruppe (151,152).

Auch ohne iatrogene Manipulation sind während eines akuten ischämischen Ereignisses bei Patienten endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) erhöht (153). Erhöhte Spiegel zirkulierender EPCs sind mit einer verminderten Letalität bei Patienten mit KHK verbunden (154). Auch EPO ist ein starker Stimulus für die Mobilisierung von endothelialen Zellen. Die erhöhte Verfügbarkeit endothelialer Zellen ist verbunden mit einer vermehrten Neovaskularisierung in ischämischen Geweben (132).

Ob der Zeitpunkt des Behandlungsbeginn einen Einfluss auf das Outcome des

Patienten hat, wird von Schachinger (150,155) untersucht. Interessanterweise zeigt sich hier, dass Patienten mit verzögertem Behandlungsbeginn (4 vs. 8 Tage nach AMI) einen besseren Effekt auf Ejektionsfraktion im weiteren Verlauf haben (151). Berücksichtigt man den zellprotektiven Effekt von Stammzellen mit einem zu erwartenden geringeren Anteil von apoptotischen Zellen, so müsste eine möglichst frühe Therapie das Ergebnis verbessern. Dies mag an einem schlechteren Homing von Zellen in der Frühphase nach Reperfusion liegen und mit einer damit vergesellschafteten schlechteren funktionellen Aktivität der Zellen (151).

In weiteren Experimenten kann jedoch auch in der Akutphase ein positiver Effekt durch die Applikation von eEPCs gesehen werden. Durch die Therapie mit diesen Zellen unmittelbar nach Ischämie kann eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion erreicht werden. Die Infarktgröße kann durch die Gabe von EPCs signifikant verringert werden. Bei gleichzeitiger Applikation von Wortmannin ist der Effekt nicht zu beobachten, was auf eine PI 3K vermittelte Wirkungsweise hindeutet. Ebenso kann in dieser Studie nachgewiesen werden, dass es zu einer Anreicherung von EPCs im ischämischen Gebiet kommt (133).

So wird gezeigt, dass vier Wochen nach Ereignis und Zell-basierter Behandlung Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  und IL-6 im Vergleich zu unbehandelten Tieren vermindert waren (156). Durch das so modulierte Remodeling zeigt sich insgesamt eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine verminderte myokardiale Fibrose (156-158). Auch bei akuter Anwendung zeigen EPCs einen direkten antiapoptotischen Effekt. Dieser wird durch sezernierte Substanzen verursacht, die Phospho-Inositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K-AKT) vermittelt eine direkte Zytoprotektion bewirken (133).

In Zusammenschau unserer eigenen Ergebnisse zeigt sich für beide Substanzen ein deutlicher kardioprotektiver Effekt.

Ebenso wie die EPCs weist auch EPO eine Phospho-Inositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K-AKT) vermittelte Wirkung mit konsekutiver direkter Zytoprotektion auf (56). Immunmodulatorisches Potential ist beiden Gruppen zu attestieren (156,159).

Es erscheint daher nicht verwunderlich, dass Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und EPO bestehen.

Wie erwähnt postulieren einige Autoren, dass EPO nur dann eine Wirkung zeigt, wenn es so hoch dosiert ist, dass es Stammzellen mobilisiert. EPCs weisen wie

adulte Endothelzellen einen EPO Rezeptor auf (134,160).

Bei der Einwanderung von Leukozyten mitigiert EPO diesen Effekt deutlich, jedoch nicht in der Art und Weise wie eEPCs. Über die Ursachen kann nur spekuliert werden, da beiden Agentien dieses Potential attestiert wird (114,115,160). Vielleicht mag dies an der geringeren Halbwertszeit liegen, die in der Literatur zwischen sieben und neun Stunden angegeben wird. Die Wirkzeit der eEPCs mag als vitales Gewebe deutlich darüber liegen.

Bei der funktionellen Messung sowie bei der histologischen Auswertung kann ein Vorteil auf der mit Zellen therapierten Seite gesehen werden. Einzig der LVEDP zeigt sich im Vergleich bei der Hormontherapie geringer. In der randomisierten Studie von Janssens kann zwar kein Effekt auf die globale linksventrikuläre Funktion gesehen werden, jedoch zeigen sich deutliche Effekte im Bezug auf die regionale Ejektionsfraktion und auf die Infarktgröße (161).

Die funktionelle Überlegenheit der Zelltherapie mag zum einen durch den initial etwas kleineren Infarkt und die kleinere AAR bedingt sein. Zum anderen mag auch die Verteilung im Organismus eine Rolle spielen, da die Zellen gezielt in das ischämie Gebiet einwandern (92). Bei einer geringen Anzahl von Versuchstieren in der EPO-Gruppe können diese Ergebnisse jedoch nur als Trend gesehen werden.

Die Wirksamkeit der Zelltherapie wird jedoch bereits in klinischen, Placebo kontrollierten Studien angewendet (150,151).

Auch auf die Adhäsion scheint EPO keinen Effekt zu haben. Dies haben wir in vitro nachgewiesen. Es kommt in unserem Versuch zu keiner vermehrten Adhäsion von eEPCs nach Inkubation von Hypoxie exponierten endothelialen Zellen mit EPO. Tatsache ist jedoch, dass das Substrat die Zahl der verfügbaren Stammzellen erhöht (132,162). Dies geschieht zum einen durch die Mobilisierung aus dem Knochenmark, zum anderen haben auch endotheliale Stammzellen einen EPO-Rezeptor, der auch in diesen Zellen zu einer verminderten Apoptose führt.

eEPCs weisen kardioprotektive Eigenschaften auf (133). In unseren Versuchen konnten wir jedoch keinen additiven Effekt in vitro nachweisen. Die einmalige hochdosierte Administration von EPO im Großtierversuch erhöht zumindest den Hämokrit und den Hb nicht, so dass nicht von einer Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark ausgegangen werden kann.

## 4.5 Applikation

Eine Besonderheit an den von uns durchgeführten Versuchen ist die regionale Verabreichung von EPO. Aufgrund dessen soll im Folgenden auf die Applikationsart eingegangen werden. Epo kann intravenös, intraperitoneal, intrakardial oder selektiv mittels eines Katheterversfahrens appliziert werden. Selektiv kann es sowohl venös als auch arteriell gegeben werden.

Ziel ist es, lokal eine hohe Konzentration des Wirkstoffs bei möglichst geringer systemischer Gesamtdosis zu erreichen.

Bei der intravenösen Applikation wird das Agens in eine periphere oder zentrale Vene appliziert. Die Konzentration im betroffenen Areal ist hierbei gering. Dies liegt am großen Verteilungsvolumen, an der Proteinbindung und an einem ausgeprägten first pass uptake der Lunge (163). Kastrup et al beschreiben, dass bei intravenöser Applikation nur 0,5% des Agens im betroffenen Areal eines Wachstumsfaktors zur Verfügung steht (164). Eine hohe Dosis geht mit vermehrten Nebenwirkungen einher. Kritisch zu betrachten ist hierbei vor allem die Veränderungen der Rheologie durch Erhöhung des Hämatokrits. So ist beschrieben, dass eine starke Erhöhung des Hämatokrits mit einer Übersterblichkeit kardial erkrankter Patienten einhergeht (165). Nicht nur bei kardial erkrankten Patienten, sondern auch bei Gesunden führt ein übermäßig erhöhter Hämatokrit zu einem erhöhten Risiko für einen Schlaganfall oder ein kardiovaskuläres Ereignis (166). Bewiesen ist andererseits auch, dass sich durch eine Erhöhung des Hämatokrits das Sauerstoffangebot verbessert. Als ideal ist hier ein Wert um die 30 anzusehen. In der Literatur wird beschrieben, dass eine einmalige systemische Injektion von 5000IE/kg Körpergewicht EPO keine Veränderung des Hämatokrits hervorruft (167). Im Großtierversuch im Rahmen unserer Studien wurden 20.000IE EPO appliziert. Wie erwartet konnte nach 24 Stunden kein Anstieg des Hämatokrits nachgewiesen werden. Sicherlich ist rein technisch gesehen die intravenöse Applikation die unkomplizierteste. Des Weiteren gibt es in der Literatur keinerlei Hinweise auf eine LD<sub>50</sub> (147).

Eine intrakardiale Applikation erreicht sicherlich bei geringster Dosis die größtmögliche Konzentration im geschädigten Areal. Dieses Verfahren ist jedoch aufwändig. Weitere Risiken sind ggf. eine lokale Entzündung sowie die Fibrosierung der Injektionsstelle (168). Das Areal muss bei der lokalen Anwendung zeitintensiv

lokalisiert werden. Im akuten Infarkt ist jedoch Zeit ein wichtiger Prognose-Faktor (9). Auch Blutungen und bei Ausbildung eines Wandaneurysmas sogar Myokardrupturen sind bei dieser Technik denkbar. Da bei einem akuten Ereignis ein Eingriff mit einem erhöhtem Risiko verbunden ist, ist dieses Verfahren somit als unpraktikabel zu werten.

Eine interventionelle, intraluminale lokale Applikation ist nur mit einem geringen Trauma verbunden. Sowohl der arterielle als auch der venöse Anteil des Gefäßsystems ist mit dieser Methode gut zu erreichen. Die Dosis kann unter diesen Aspekten gegenüber der intravenösen Darreichungsform sicherlich reduziert werden. Wir haben uns für dieses Verfahren entschieden, da damit eine adäquate Dosis in das betroffene Areal appliziert werden kann. Systemische Wirkungen können im beobachteten Zeitraum nicht festgestellt werden. Trotz der Verletzung einer Vene in einem unserer Versuchstiere ist dieses Verfahren als sicher anzusehen und somit auch im klinischen Gebrauch denkbar. Da aber bei der Intervention nach wie vor die Wiedereröffnung des betroffenen Coronargefäßes im Vordergrund steht, ist dieses spezielle Verfahren sicherlich nur in einigen speziellen Indikationen denkbar. Gut vorstellbar ist jedoch die lokale antegrade Applikation nach Eröffnung des betroffenen Gefäßes. Hier müßte, um eine sofortige Ausschwemmung zu vermeiden, eine low-flow Situation geschaffen werden. Technisch wäre dies mittels einem over-the-wire Ballonkatheter möglich.

## **4.6 Klinische Erfahrungen mit Erythropoietin**

Trotz zahlreicher hoffnungsvoller experimenteller Daten sind die ersten klinischen Studien ernüchternd. Mittlerweile existieren placebokontrollierte, klinische, prospektive, randomisierte Studien, die keine Kardioprotektion nachweisen konnten. In diesen Arbeiten wurde EPO hochdosiert vor einer Intervention bzw. Operation verabreicht. Bei Bypassoperationen konnten Joyeux-Faure et al. durch den additiven Einsatz von EPO keine Verbesserung der mit einer Ischämie vergesellschafteten Entzündungsreaktion nachweisen (169). Auch die Marker für eine myokardiale Schädigung unterschieden sich nicht von der Placebogruppe.

Bei der Applikation vor einer PTCA bei ST Hebungsinfarkt sahen Ludman et al. sogar zunächst eine Verschlechterung der kardialen Funktion. Microvaskuläre Obstruktion



trat bei doppelt so vielen Fällen auf, linksventrikuläres enddiastolisches Volumen und die linksventrikuläre Hypertrophie waren in der EPO- Gruppe signifikant erhöht, erreichten aber nach vier Wochen das Niveau der Placebo- Gruppe (170).

In Anbetracht eigener Daten, in welchen wir in den komplexeren Versuchsaufbauten zum Teil nur eine tendentielle Verbesserung sehen konnten, erscheinen diese Studienergebnisse nachvollziehbar. Offensichtlich sind die kardioprotektiven Eigenschaften des Hormons in Relation zum deletären Ereignis eines Herzinfarktes oder einer längeren Ischämie zu schwach, um einen sichtbaren Benefit zu erzielen. Ganz im Gegenteil scheint sich, wie bei Ludman beschrieben, der artifizielle Zusatz von EPO zunächst gegenteilig auszuwirken.

Natürlich ist auch der Unterschied zwischen jungen Versuchstieren und alten multi-morbiden Patienten mit zum Teil fehlenden Regenerationsreserven nicht zu unterschätzen (26,171).

Klinisch interessant erscheint auch die Tatsache, dass EPO die Blutungszeit unter Aspirin wieder normalisiert (170).

Die Dosis mag jedoch sicher auch eine Rolle spielen. In der Arbeit von Ludman wurde eine Einmaldosis von 50.000IE EPO (aktuell empfohlene Dosis bei Anämie bei Niereninsuffizienz 720 IE/kg pro Woche) intravenös appliziert. Dass bei dieser Dosis auch kurzfristig mit entsprechenden Nebenwirkungen zu rechnen ist, erscheint nicht verwunderlich. Betrachtet man ältere Studien so zeigt sich, dass eine hohe EPO-Dosis bereits hier mit einer erhöhten Komplikationsrate bzw. Mortalität vergesellschaftet ist.

Eine Metaanalyse von 94.569 Dialysepatienten zeigte einen Anstieg der Mortalität unter intensivierter EPO Therapie (172).

Bei Patienten mit Schlaganfall zeigte EPO keinen positiven Effekt. Im Gegenteil kam es in dieser Gruppe zu einer Übersterblichkeit (9% vs 16% in der EPO Gruppe) (173).

Die Postkonditionierung mit einem einmaligen hochdosierten Bolus erscheint nach der Ludman Studie obsolet. Nicht unerwähnt soll jedoch bleiben, dass die niedrig dosierte chronische Anwendung von EPO nach einem ischämischen Event sehr wohl vielversprechende Ergebnisse aufweist. In dieser Arbeit wurde drei Wochen nach einer erfolgreichen Intervention für sechs Monate Erythropoietin niedrig dosiert appliziert (35IE/kgKG s.c. einmal pro Woche). Diese Therapie erbrachte eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion. Negative Effekte blieben aus. Trotz

der geringen Patientenzahl (24 Patienten) und der Tatsache, dass ST-Hebungsinfarkte ausgeschlossen waren, ist diese Studie in Zusammenschau mit den experimentellen Daten doch mit einer gewissen Hoffnung verbunden (174).

## **5 Zusammenfassung**

Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob EPO einen akuten Effekt auf das ischämische Herz hat, ob die Wirkung durch Koapplikation mit eEPCs verstärkt wird und ob es bei retrograder Applikation von EPO zu einer Kardioprotektion kommt.

Die Studie lässt sich in drei Modelle aufteilen: In Modell eins werden die Effekte in der Zellkultur untersucht. Hier werden eEPCs und EPO an hypoxischen Myozyten untersucht. Des Weiteren wird geklärt, ob EPO einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der EPCs hat.

In Modell zwei werden die verschiedenen Substanzen am isolierten Organ untersucht. Hierfür werden murine Herzen im Langendorff-Aufbau einer globalen Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt. Wie in der Zellkultur sind auch hier andere parakrine Einflüsse ausgeschaltet. Die Kardioprotektion wird mittels AKT und pAKT quantifiziert.

In Modell drei werden nun Schweine durch Okklusion eines Seitenastes der LAD einer akuten Ischämie für eine Stunde ausgesetzt. Dieses Modell entspricht dem akuten Myokardinfarkt beim Menschen. Die Ischämiezeit von einer Stunde entspricht auch der geforderten Rekanalisierungszeit der aktuellen Leitlinien. Ab Minute eins der Reperusionsphase wurde mittels SSR-Katheter EPO appliziert.

Es zeigen sich in allen Versuchsanordnungen Hinweise auf eine Kardioprotektion durch EPO. Dieser Effekt ist nach unseren Ergebnissen auf eine direkte rezeptorvermittelte Wirkung zurückzuführen. EPO und eEPCs sind im Bereich der Kardioprotektion gleichwertig. Es kann kein additiver Effekt bei gleichzeitiger Applikation von EPO und eEPCs beobachtet werden. Nach unseren Erkenntnissen ist die Applikation von EPO mittels SSR Katheter ein praktikabler Weg. Die so behandelten Tiere zeigen ein kleineres Infarktareal bei nahezu unveränderter AAR.

Nach den in dieser Arbeit vorgestellten Daten erscheint die Anwendung von EPO bei akuten kardialen Ereignissen vielversprechend. In aktuellen klinischen prospektiven

randomisierten Studien konnte die Substanz die Erwartungen jedoch nicht erfüllen. Eine einmalige hochdosierte Gabe zur Verminderung des Reperfusionsschadens scheint nach aktueller Datenlage nicht benefituell zu sein.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AAR	area at risc
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AKT	Proteinkinase B
AP-1	Activator Protein-1
bHLH-PAS	basic helix loop helix Per-ARNT-Sim Protein
BMI	Body mass index
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CK-MB	Muscle-brain-type Creatine kinase
CT-1	Cardiotrophin-1
CXCR-4	CXC Chemokine Rezeptor-4
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEPC	embryonale endotheliale Progenitorzellen
eNOS	endothelial NO-Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzellen
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietinrezeptor
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases ½
ESL	E-Selektin-Ligand
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
H+	Wasserstoff

HCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
i-NOS	inducable NO-Synthase
Jak 2	Januskinase-2
KCL	Kaliumchlorid
Kh <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LAD	Left anterior descending artery
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPK	mitogen-activated protein- Kinase
MEK	mitogen extracellular signal-regulated kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non ST elevation myocardial infarction
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
PAF	platelet activating factor

PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PTCA	perkutane transluminale Koronar Angioplastie
PTP	Mitochondrial permeability transition pore
RCX	Ramus circumflexus
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
βcR	Beta common Rezeptor
S.D.	Standard deviation
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
SSR	synchronized suction and retroinfusion
STAT 5	Signal transducing and activators of transcription 5
STEMI	ST elevation myocardial infarction
TGF-β1	Transforming growth factor-1
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UN	United nations
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World health organization
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 **Abbildungsverzeichnis** Seite

Abb. 01	EPO Pathway aus Maiese et al (55)	11
Abb. 02	Langendorff Versuchsaufbau aus Granetzny et al (96)	20
Abb. 03	Sonomicrometrikristalle	24
Abb. 04	Hypoxiekammer Myozyten	30
Abb. 05	Adhäsionsversuch	31
Abb. 06	AKT in % zur Kontrolle	33
Abb. 07	pAKT in % zu AKT Versuchsgruppen	34
Abb. 08	pAKT in Prozent zur Kontrolle	35
Abb. 09	Graphische Darstellung der pAKT in % zur Kontrolle	35
Abb. 10	Vergleichende Darstellung der Leukozytenzahl pro Milligramm Feuchtgewicht bei EPO und eEPC therapierten Tieren	36
Abb. 11	LVEDP im Kontroll- und bei den behandelten Tieren in mmHg	38
Abb. 12	Regionale Myokardfunktion der Infarktzone ohne Schrittmacheraktion, bei einer Herzfrequenz von 120/min und bei 150/min	39
Abb. 13	Regionale Myokardfunktion der AAR ohne Schrittmacheraktion, bei einer Herzfrequenz von 120/min und bei 150/min	40
Abb. 14	Vergleichende Darstellung des Blutbildes vor und nach Ereignis bzw. Therapie	42
Abb. 15	Schnitt eines mit EPO behandelten Herzens	43
Abb. 16	Größe der AAR in % des linken Ventrikels	43
Abb. 17	Schnitt eines mit EPO behandelten Herzens	44
Abb. 18	Infarktgröße in Prozent der AAR	44
Abb. 19	Wirkung von Stammzellen bei Kardiovaskulären Reparaturvorgängen, aus Dimmeler et al 2008	56

## 8 Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1:

AKT-Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin.

32

Tabelle 2:

pAKT-Expression in isolierten Zellen nach Hypoxie Reperfusion unter Zugabe von Puffer (Kontrolle), 150000 embryonalen EPCs, 1 Mio embryonalen EPCs, 12IE Erythropoietin (EPO), 150000 embryonalen EPCs und 12 IE Erythropoietin.

33

Tabelle 3:

Leukozyten pro mg Feuchtgewicht

36



## 9 Literaturverzeichnis

1. Mathers C, Fat D M, Boerma J T. The global burden of disease. 2004 update. World Health Organization, (ISBN: 9241563710), 2008
2. Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes 2008. Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4, 2010.
3. Gerd Herold und Mitarbeiter. Innere Medizin. Eine Vorlesungsorientierte Darstellung 2005. (ISBN: B00916J97M), 2005
4. Wong CK, White HD. Implications of the new definition of myocardial infarction. Postgrad Med J 81(959): 552-555, 2005.
5. Hamm CW. Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS). Der Kardiologe 3(2): 81-100, 2009.
6. Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Erkrankungen des Herz/Kreislaufsystems sind häufigste Todesursache im Jahr 2006. Pressemitteilung des Statistischen Bundesamtes Nr.385 vom 21.09. 2007. [www.destatis.de](http://www.destatis.de), 2007.
7. MONICA/KORA-Herzinfarktregister Augsburg. Daten zu Herzinfarkten in der Region Augsburg 2007 (Mortalität, Morbidität, Letalität, Vorerkrankungen, medizinische Versorgung). [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de), 2012.
8. Löwel H, Meisinger C, Heier M, Hörmann A, Kuch B, Gostomzyk J, Koenig W. Geschlechtsspezifische Trends von plötzlichem Herztod und akutem Herzinfarkt. Dtsch Med Wochenschr 127(44): 2311-2316, 2002.
9. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Roger VL, Turner MB, On behalf of the American Heart Association Heart Disease and Stroke Statistics Writing Group. Heart Disease and Stroke Statistics--2011 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 123(4): e18-209, 2011.
10. Löwel H, Döring A, Schneider A, Heier M, Thorand B, Meisinger C. The MONICA Augsburg Surveys - Basis for Prospective Cohort Studies. Gesundheitswesen 67(1):13-18, 2005.

11. Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplantation proceedings* 25(2):2041-2043, 1993
12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423): 801-809,1993.
13. Bonomini F, Tengattini S - Fabiano, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and histopathology* 23(3): 381-390, 2008.
14. Zhang ZH, Zhou SH, Qi SS, Li X. Oxidative stress and inflammation with angiographic morphology of coronary lesions in patients with coronary heart disease. *Journal of Central South University. Medical sciences* 31(4): 556-559, 2006.
15. Fazio G, Sutera L, Zito R, Cascio C, Briguglia D, Taormina S, Giammanco A, Assennato P, Novo S. Rupture of the atherosclerotic plaque: is Chlamydia pneumoniae a possible agent? *Giornale italiano di cardiologia* 7(12): 809-814, 2006.
16. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KAA, Julian D, Lengyel M, Neumann FJ, Ruzyllo W, Thygesen C, Underwood SR, Vahanian A, Verheugt FWA, Wijns W. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 24(1): 28-66, 2003.
17. Böcker, Denk, Heitz. *Pathologie. 2., vollständig überarbeitete Auflage.* (ISBN: 3-437-42380-0). Urban Fischer Verlag, München Jena. S.452, 2001.
18. Erlebacher JA, Richter RC, Alonso DR, Devereux RB, Gay WA, Jr. Early infarct expansion: structural or functional? *Journal of the American College of Cardiology*, 6(4): 839-844,1985.
19. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 27(6):1281-1292, 1995
20. Dietz R, Osterziel KJ , Willenbrock R, Gulba DC,von Harsdorf HR. Ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 82(1):73-75, 1999
21. Faxon DP. Coronary interventions and their impact on post myocardial infarction survival. *Clin Cardiol.* 28(11): 38-44, 2005.
22. Ronner E, Boersma E, Laarman GJ, Somsen GA, Harrington RA, Deckers JW, Topol EJ, Califf RM, Simoons ML. Early angioplasty in acute coronary syndromes without persistent ST-segment elevation improves outcome but increases the need for six-month repeat revascularization: an analysis of the PURSUIT Trial. Platelet glycoprotein IIB/IIIA in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 39(12):1924-1929, 2002.

23. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Comparison of primary and facilitated percutaneous coronary interventions for ST-elevation myocardial infarction: quantitative review of randomised trials. *Lancet*. 367(9510):579-588, 2006.
24. Bolli R, Marban E. Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning. *Physiol Rev* 79(2): 609-634, 1999.
25. Camici PG, Prasad SK, Rimoldi OE. Stunning, Hibernation, and Assessment of Myocardial Viability. *Circulation* 117(1): 103-114, 2008.
26. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 357(11): 1121-1135, 2007.
27. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 263(3): 1353-1357, 1988.
28. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzyme release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 5(4): 395-407, 1973.
29. Zweier JL, Talukder MAH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 70(2): 181-190, 2006.
30. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 38(2): 291-300, 1998.
31. Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C, Moore J, Daemmgen J, Gross GJ. Inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Confers Greater Cardioprotection Against 90 Minutes of Myocardial Ischemia Than Ischemic Preconditioning in Dogs. *Circulation* 100(25): 2519-2526, 1999.
32. Klein HH, Pich S, Lindert S, Nebendahl K, Warneke G, Kreuzer H. Treatment of reperfusion injury with intracoronary calcium channel antagonists and reduced coronary free calcium concentration in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *Journal of the American College of Cardiology* 13(6): 1395-1401, 1989.
33. Boden WE, van Gilst WH, Scheldewaert RG, Starkey IR, Carlier MF, Julian DG, Whitehead A, Bertrand ME, Col JJ, Pedersen OL, Lie KI, Santoni JP, Fox KM. Diltiazem in acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 355(9217): 1751-1756, 2000.
34. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL, for the ESCAMI Investigators. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 38(6): 1644-1650, 2001.

35. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata HF, Trollinger DR, Herman BF, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. 76: 99-114, 1996.
36. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290(5): 2024-2034, 2006.
37. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 61(3): 481-497, 2004.
38. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35(4): 339-341. 2003.
39. Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y. Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens. *Dtsch Med Wochenschr* 133(12): 586-590, 2008.
40. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, Peto R. ISIS-2: 10áyear survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. *BMJ* 316(7141): 1337-1343, 1998.
41. Arntz HR, Bossaert LF, Filippatos GS. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 5. Initial management of acute coronary syndromes. *Resuscitation*. 67(1): 87-96, 2005
42. Pedrazzini G, Santoro E, Latini R, Fromm L, Franzosi MG, Mocetti T, Staszewsky L, Barlera S, Tognoni G, Maggioni AP. Causes of death in patients with acute myocardial infarction treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors: Findings from the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto (GISSI)-3 trial. *American Heart Journal* 155(2): 388-394, 2008.
43. Aronow WS. Treatment after myocardial infarction. *Compr Ther* 33(1):39-47, 2007
44. Kernis SJ, Harjai KJ, Stone GW, Grines LL, Boura JA, O'Neill WW, Grines CL. Does beta-blocker therapy improve clinical outcomes of acute myocardial infarction after successful primary angioplasty? *Journal of the American College of Cardiology*. 43(10): 1773-1779, 2004.
45. Roger VL Weston SA, Redfield MM, Hellermann-Homan JP, Killian J, Yawn BP, Jacobsen SJ. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 292(3): 344-350, 2004.
46. Löwel H, Robert-Koch-Institut . Koronare Herzkrankheit und akuter

Myokardinfarkt. Berlin Robert-Koch-Institut B. 2006.

47. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research* 61(3): 448-460, 2004.
48. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Research in Cardiology* 100(5): 397-403, 2005.
49. Henry DH, Bowers P, Romano MT, Provenzano R. Epoetin alfa. Clinical evolution of a pleiotropic cytokine. *Arch Intern Med* 164(3): 262-276, 2004.
50. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 8(7): 718-724, 2002.
51. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology* 78(3): 183-205, 2007.
52. Hofer T, Wenger H, Gassmann M. Oxygen sensing, HIF-1[alpha] stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflugers Arch* 443(4): 503-507, 2002.
53. Cioffi CL, Qin Liu X, Kosinski PA, Garay M, Bowen BR. Differential regulation of HIF-1[alpha] prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303(3): 947-953, 2003.
54. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 phds. How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107(1): 1-3, 2001.
55. Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC. Erythropoietin: Elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* 85(2): 194-213, 2008.
56. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308(4): 990-994, 2003.
57. Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-Kinase Signaling Is Required for Erythropoietin-Mediated Acute Protection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 109(17): 2050-2053, 2004.
58. Miki T, Miura T, Tanno M, Nishihara M, Naitoh K, Sato T, Takahashi A, Shimamoto K. Impairment of cardioprotective PI3K-Akt signaling by post-infarct ventricular remodeling is compensated by an ERK-mediated pathway. *Basic Research in Cardiology. Basic Res Cardiol* 102(2):163-70, 2007.
59. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA, Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin

protects the infant heart against ischemia reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Research in Cardiology* 100(3): 187-197, 2005.

60. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 86(3): 681-687, 1990.
61. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *PNAS* 87(15): 5978-5982, 1990.
62. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin Receptor mRNA Expression in Human Endothelial Cells. *PNAS* 91(9): 3974-3978, 1994.
63. Brunet P, Lorec AM, Leonetti F, Roubicek C, Jaber K, Roux F, Berland Y. Plasma endothelin in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephrology Dialysis Transplantation* 9(6): 650-654, 1994.
64. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 47(3): 740-745, 1995.
65. Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W. Erythropoietin induces Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* 24(2): 392-397, 1996.
66. Gogusev J, Zhu DL, Herembert T, Ammarguella F, Marche P, Drueke T. Effect of Erythropoietin on DNA Synthesis, Proto-oncogene Expression and Phospholipase C Activity in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199(2): 977-983, 1994.
67. Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neuroscience Research* 44(4): 391-403, 2002.
68. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A Potential Role for Erythropoietin in Focal Permanent Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19(6): 643-651, 1999.
69. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y. Brain Capillary Endothelial Cells Express two forms of Erythropoietin Receptor mRNA. *European Journal of Biochemistry* 239(2): 494-500, 1996.
70. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76(1): 105-116, 1996.
71. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfratella A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin

and common beta-subunit heteroreceptor. PNAS 101(41): 14907-14912, 2004.

72. Rossert J, Fouqueray B, Boffa JJ. Anemia Management and the Delay of Chronic Renal Failure Progression. J Am Soc Nephrol 14(7): 173-177, 2003.
73. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sir  n AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 8(8):495-505, 2002.
74. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, R  ther E, Cerami A, Becker W, Siren AL. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. Mol Psychiatry 9(1): 42-54, 2003.
75. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin Biology in Cancer. Clinical Cancer Research 12(2): 332-339, 2006.
76. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. Cancer 95(5): 969-981, 2002.
77. Kayser K, Gabius HJ. Analysis of expression of erythropoietin-binding sites in human lung carcinoma by the biotinylated ligand. Zentralbl Pathol 138(4): 266-270, 1992.
78. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. Kidney Int 58(2): 647-657, 2000.
79. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. Hypoxia-Inducible Erythropoietin Signaling in Squamous Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix and Its Potential Role in Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. The American Journal of Pathology 162(6): 1789-1806, 2003.
80. Kumar SM, Acs G, Fang D, Herlyn M, Elder DE, Xu X. Functional Erythropoietin Autocrine Loop in Melanoma. The American Journal of Pathology 166(3): 823-830, 2005.
81. Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Metivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G. Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappa B rescue pathway. Oncogene 24(5): 737-745, 2004.
82. Depping R, Kawakami K, Ocker H, Wagner JM, Heringlake M, Noetzold A, Sievers HH, Wagner KF. Expression of the erythropoietin receptor in human heart. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 130(3): 877-878, 2005.
83. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H,

Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circulation* 103(5): 634-637, 2001.

84. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39(5): 733-742, 2005.
85. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 95(4): 343-353, 2004.
86. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-Based Therapy of Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(2): 208-216, 2008.
87. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-49, 2002.
88. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275(5302): 964-966, 1997.
89. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9(6): 702-712, 2003.
90. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125(8): 1457-1468, 1998.
91. Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK, Beltinger C. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell* 5(5): 477-488, 2004.
92. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK. Multistep Nature of Microvascular Recruitment of Ex Vivo expanded Embryonic Endothelial Progenitor Cells during Tumor Angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 197(12): 1755-1765, 2003.
93. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of Human Stem Cell Engraftment and Repopulation of NOD/SCID Mice on CXCR4. *Science* 283(5403): 845-848, 1999.
94. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, renzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Impaired CXCR4 Signaling Contributes to the Reduced Neovascularization Capacity of



- Endothelial Progenitor Cells From Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res* 97(11): 1142-1151, 2005.
95. Jager DF, Seliger CF, Redpath NT, Friedrich IF, Silber RE, Ponicke KF, Werdan KF, Muller-Werdan U. Heterogeneity of cardiac rat and human elongation factor 2. *Electrophoresis* 21(13): 2729-2736, 2000
  96. Granetzny A, Gams E, Schipke JD, Schwanke U. Effects of a BradycardicAgent (DK-AH 269) on Haemodynamics an Oxygen Consumption of Isolated Blood-Perfused Rabbit Hearts. *Journal of Clinical and Basic Cardiology* 3(3): 191-196. 2000.
  97. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *Journal of Pharmacological Methods* 14(3): 157-167, 1985.
  98. Xia Y, Zweier JL. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues. *Analytical Biochemistry* 245(1): 93-96, 1997.
  99. White FC, Roth DM, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci* 36(4):351-356, 1986.
  100. Michael Swindle M, Smith AC. Swine in Biomedical Research. In: Conn PM, ed. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Humana Press: 233-239, 2008.
  101. Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 253(5): 1279-1288, 1987.
  102. Eckstein RW. Coronary Interarterial Anastomoses in Young Pigs and Mongrel Dogs. *Circ Res* 2(5): 460-465, 1954.
  103. Most AS, Williams DO, Millard RW. Acute coronary occlusion in the pig: Effect of nitroglycerin on regional myocardial blood flow. *The American Journal of Cardiology* 42(6): 947-953, 1978.
  104. Sjöquist P-O, Duker G, Almgren O. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Research in Cardiology* 79(2): 164-175, 1984.
  105. Millard RW. Changes in Cardiac Mechanics and Coronary Blood Flow of Regionally Ischemic Porcine Myocardium Induced By Diltiazem. *Chest* 78(1): 193-199, 1980.
  106. Rouslin W, Millard RW. Mitochondrial inner membrane enzyme defects in porcine myocardial ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 240(2): H308-H313, 1981.
  107. Warltier DC, Zyvoloski MG, Gross GJ, Brooks HL. Subendocardial versus transmural myocardial infarction: relationship to the collateral circulation in

- canine and porcine hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 60(12):1700-1706, 1982.
108. Wakida Y, Nordlander R, Kobayashi S, Kar S, Haendchen R, Corday E. Short-term synchronized retroperfusion before reperfusion reduces infarct size after prolonged ischemia in dogs. *Circulation* 88(5): 2370-2380, 1993.
  109. Fedor JM, McIntosh DM, Rembert JC, Greenfield JC. Coronary and transmural myocardial blood flow responses in awake domestic pigs. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 235(4): 435-444, 1978.
  110. Shen YT, Vatner SF. Differences in myocardial stunning following coronary artery occlusion in conscious dogs, pigs, and baboons. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 270(4): 1312-1322, 1996.
  111. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest* 85(4): 1090-1098, 1990.
  112. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 61(6): 291-332, 1895.
  113. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55(2): 113-126, 2003.
  114. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovascular Research* 71(4): 684-694, 2006.
  115. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology* 55(5): 662-675, 1994.
  116. Strunk T, Härtel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C. Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatrica* 97(1): 16-20, 2008.
  117. George J, Goldstein E, Abashidze A, Wexler D, Hamed S, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovascular Research* 68(2): 299-306, 2005.
  118. Boekstegers P, Diebold J, Weiss C. Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovascular Research* 24(6): 456-464, 1990.
  119. Kupatt CF, Wichels RF, Deiss MF, Molnar AF, Lebherz CF, Raake PF, von Degenfeld GF, Hahnel DF, Boekstegers P. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.*

9(8):518-526, 2002.

120. von Degenfeld G, Giehl W, Boekstegers P. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovascular Research* 35(2): 233-240, 1997.
121. Kastrup J, Jörgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, Bötter HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyöngyösi M, Sylven C. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris: A randomized double-blind placebo-controlled study: The Euroinject One trial. *Journal of the American College of Cardiology* 45(7): 982-988, 2005.
122. Meer Pvd, Lipsic E, Henning RH, de Boer RA, Suurmeijer AJH, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Heart Failure* 6(7): 853-859, 2004.
123. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts From Rodents Exposed to Intermittent Hypoxia or Erythropoietin Are Protected Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation* 108(1): 79-85, 2003.
124. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 18(9):1031-1033, 2004.
125. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *PNAS* 100(8): 4802-4806, 2003.
126. Guglin ME, Koul D. Cardiovascular effects of erythropoietin: anemia and beyond. *Cardiol Rev* 14(4): 200-204, 2006.
127. Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 19(10):1323-1325, 2005.
128. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M, Ono M, Watanabe J, Shirato K, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important Role of Endogenous Erythropoietin System in Recruitment of Endothelial Progenitor Cells in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *Circulation* 113(11): 1442-1450, 2006.
129. Jaquet KF, Krause KF, Tawakol-Khodai MF, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 64(2): 326-333, 2002
130. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors

- AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin Induces Neovascularization and Improves Cardiac Function in Rats With Heart Failure After Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 46(1): 125-133, 2005.
131. Bahlmann FH, Degroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin Rapid Communication. *Kidney Int* 64(5): 1648-1652, 2003.
  132. Heesch C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102(4): 1340-1346, 2003.
  133. Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Muller S, Delker S, Gildehaus FJ, Buning H, Hatzopoulos AK, Boekstegers P. Retroinfusion of Embryonic Endothelial Progenitor Cells Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase. *Circulation* 112(9): 117-122, 2005.
  134. Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(1): 522-529, 2006.
  135. Kristensen J, Maeng M, Rehling M, Berg JS, Mortensen UM, Nielsen SS, Nielsen TT. Lack of acute cardioprotective effect from preischemic erythropoietin administration in a porcine coronary occlusion model. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 25(5): 305-310, 2005.
  136. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 288(2): 971-976, 2005.
  137. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin Is a Novel Vascular Protectant Through Activation of Akt1 and Mitochondrial Modulation of Cysteine Proteases. *Circulation* 106(23): 2973-2979, 2002.
  138. Neviere RR, Cepinskas G, Madorin WS, Hoque N, Karmazyn M, Sibbald WJ, Kvietys PR. LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 277(3): 885-892, 1999.
  139. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, Smith CW. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J* 5(11): 2529-2537, 1991.
  140. Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, Kvietys PR. Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(1): 440-447, 2001.
  141. Binbrek AS, Mittal BF, Rao KN, Sobel BE. The potential of erythropoietin for

- conferring cardioprotection complementing reperfusion. *Coron Artery Dis.* 18(7):583-585, 2007.
142. Krause KT, Jaquet K, Geidel S, Schneider C, Mandel C, Stoll HP, Hertting K, Harle T, Kuck KH. Percutaneous endocardial injection of erythropoietin: Assessment of cardioprotection by electromechanical mapping. *European Journal of Heart Failure* 8(5): 443-450, 2006.
  143. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(2): H748-H755, 2006.
  144. Miura Y, Miura O, Ihle JN, Aoki N. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 269(47): 29962-29969, 1994.
  145. Lipsic E, Westenbrink BD, van der Meer P, van der Harst P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, Schoemaker RG, van Gilst WH. Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit. *European Journal of Heart Failure* 10(1): 22-29, 2008.
  146. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin Biology in Cancer. *Clinical Cancer Research* 12(2): 332-339, 2006.
  147. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(20): 11612-11617, 2003.
  148. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation* 106(15): 1913-1918, 2002.
  149. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364(9429): 141-148, 2004.
  150. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24): 3009-3017, 2002.
  151. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hälschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary Bone

Marrow Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* 355(12): 1210-1221, 2006.

152. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hälschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 27(23): 2775-2783, 2006.
153. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki Ki, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 103(23): 2776-2779, 2001.
154. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, B+Ähm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med* 353(10): 999-1007, 2005.
155. Erbs S, Linke A, Schachinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, Hoffmann C, Dimmeler S, Tonn T, Hambrecht R, Zeiher AM, Schuler G. Restoration of Microvascular Function in the Infarct-Related Artery by Intracoronary Transplantation of Bone Marrow Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction: The Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) Trial. *Circulation* 116(4): 366-374, 2007.
156. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 8(6): 559-561, 2006.
157. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi JI, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization of Myocardial Ischemia. *Circulation* 107(3): 461-468, 2003.
158. KOCHER AA. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *7(4)*: 430-436, 2001.
159. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 198(6): 971-975, 2003.
160. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension* 45(3): 321-325, 2005.
161. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-

- derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367(9505): 113-121, 2006.
162. Bahlmann FH, de Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103(3): 921-926, 2004.
  163. Syed IS, Sanborn TA, Rosengart TK. Therapeutic Angiogenesis: A Biologic Bypass. *Cardiology* 101(1-3): 131-143, 2004.
  164. Kastrup J. Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease: gene or recombinant vascular growth factor protein therapy? *Curr Gene Ther.* 3(3):197-206, 2003.
  165. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA. The Effects of Normal as Compared with Low Hematocrit Values in Patients with Cardiac Disease Who Are Receiving Hemodialysis and Epoetin. *New England Journal of Medicine* 339(9): 584-590, 2009.
  166. Randy E. Ergolytic drugs in medicine and sports. *The American Journal of medicine* 94(2): 205-211. 1993.
  167. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112(7): 999-1007, 2003.
  168. Epstein SE, Kornowski R, Fuchs S, Dvorak HF. Angiogenesis Therapy : Amidst the Hype, the Neglected Potential for Serious Side Effects. *Circulation* 104(1): 115-119, 2001.
  169. Joyeux-Faure M, Durand M, Bedague D, Protar D, Incagnoli P, Paris A, Ribuot C, Levy P, Chavanon O. Evaluation of the effect of one large dose of erythropoietin against cardiac and cerebral ischemic injury occurring during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Fundamental & Clinical Pharmacology* no, 2011. *Fundam Clin Pharmacol* 26(6):761-770, 2012.
  170. Ludman AJ, Yellon DM, Hasleton J, Ariti C, Babu GG, Boston-Griffiths E, Venugopal V, Walker M, Holdright D, Swanton H, Crake T, Brull D, Moon JC, Puranik R, Mutharangu V, Taylor A, Hausenloy DJ. Effect of erythropoietin as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention: a randomised controlled clinical trial. *Heart* 97(19): 1560-1565, 2011.
  171. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Dis Model Mech* 3(1-2): 35-38, 2010.
  172. Zhang Y, Thamer M, Stefanik K, Kaufman J, Cotter DJ. Epoetin requirements predict mortality in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* 44(5): 866-876, 2004.

173. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jähnig P, Herrmann M, Knauth M, Bähr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C, for the EPO Stroke Trial Group. Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 40(12) : 647-656, 2009.
174. Bergmann MW, Haufe S, von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Mehling H, Waßmuth R, Münch I, Busjahn A, Schulz-Menger J, Jordan J, Luft FC, Dietz R. A pilot study of chronic, low-dose epoetin- following percutaneous coronary intervention suggests safety, feasibility, and efficacy in patients with symptomatic ischaemic heart failure. *European Journal of Heart Failure* 13(5): 560-568, 2011.



## 10 Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Dr.-Vater Herrn Professor Dr. med. Christian Kupatt nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die geduldige Einführung in die wissenschaftliche Arbeits- und Denkweise. Ich bedanke mich für eine hervorragende Betreuung während der Experimente und Erstellung dieser Arbeit.

Herzlichen Dank auch an Dr. med. vet. Rabea Hinkel, die mich bei den tierexperimentellen Fragestellungen meiner Arbeit unterstützte und mir während der Erstellung der gesamten Arbeit mit gutem Rat zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, vor allem Susanne Helbig, möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die technische Hilfe im Labor danken. Ohne diese freundschaftliche Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Professor Dr. med. Meßmer danke Ich für die Möglichkeit in den Räumlichkeiten am Institut für chirurgische Forschung (ICF im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin) die Experimente durchzuführen.

Gewidmet ist die Arbeit meinen Eltern, denen ich viel verdanke.

# Anlage 1

## Westernblots

**Tabelle 1**

<b>Polyacrylamid-Gel 4%</b>	
30%iges AA-Bis-AA	0,65ml
1M Tris pH 6,8	0,625ml
Millipore H2O	3,60 ml
20%iges SDS	0,025ml
Temed	0,01ml
10%iges APS	0,10ml

**Tabelle 2**

<b>Polyacrylamid-Gel 10%</b>	
30%iges AA-Bis-AA	3,20ml
1M Tris pH 8,8	3,75ml
Millipore H2O	2,75 ml
20%iges SDS	0,05ml
Temed	0,02ml
10%iges APS	0,20ml

**Tabelle 3**

<b>Running Buffer</b>	
Trisbase	30,3g
Glycine	144,0g
SDS	10g
H <sub>2</sub> O	Auffüllen bis zu einem Liter

**Tabelle 4**

<b>Lämmli-puffer 5x</b>	
SDS	1,50g
Tris (pH 6,8/1M)	3,75 ml
Bromphenol blue	0,03g
H <sub>2</sub> O	Auf 7,50 ml auffüllen
Glycerol	7,50 ml

**Tabelle 5**

<b>Blotting Buffer</b>	
Tris base	30,3g
Glycine	144,0g
H <sub>2</sub> O	Auffüllen bis zu einem Liter

## Myeloperoxidase

**Tabelle 6**

<b>Pipes-Puffer</b>	
25mM Pipes (entspricht Hepes)	5,96g
110mM NaCl	6,43g
5mM KCL	0,37g
Aqua dest.	Auf einen Liter auffüllen

pH auf 7,4 mit 10 N NaOH einstellen

**Tabelle 7**

<b>PAG-Puffer:</b>	
Pipes-Puffer	z.B. 100ml
Albumin	3%
Glucose	0,1%

**Tabelle 8**

<b>50mM Phosphatpuffer pH 6,0</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50mM	8,71g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM	6,805g/l

